

## Table des matières

|                                                                                                                                       |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Quelques remerciements .....</b>                                                                                                   | <b>- 3 -</b>  |
| <b>Partie I : Mise en contexte et objectifs du mémoire .....</b>                                                                      | <b>- 4 -</b>  |
| <b>A. Généralités sur les peptides et les protéines .....</b>                                                                         | <b>- 5 -</b>  |
| A.1. Acides aminés et structure primaire .....                                                                                        | - 5 -         |
| A.2. Conformation : structures secondaire, tertiaire et quaternaire .....                                                             | - 6 -         |
| A.2.1. Définitions .....                                                                                                              | - 6 -         |
| A.2.2. Conformation native et dénaturation .....                                                                                      | - 7 -         |
| A.3. Le cas des enzymes .....                                                                                                         | - 8 -         |
| A.4. Molécule modèle utilisée dans ce mémoire : le lysozyme d'œuf de poulet .....                                                     | - 8 -         |
| <b>B. Élaboration de couches minces de biomolécules .....</b>                                                                         | <b>- 9 -</b>  |
| B.1. Introduction aux interactions moléculaires interfaciales .....                                                                   | - 9 -         |
| B.1.1. Interaction entre une goutte liquide et une surface solide .....                                                               | - 10 -        |
| B.1.2. Adsorption d'une protéine sur une surface .....                                                                                | - 10 -        |
| B.2. Intérêts de l'élaboration de couches minces protéiques .....                                                                     | - 11 -        |
| B.2.1. Test ELISA .....                                                                                                               | - 12 -        |
| B.2.2. Les biocapteurs .....                                                                                                          | - 12 -        |
| B.3. Techniques fréquemment utilisées pour l'élaboration de couches minces de biomolécules .....                                      | - 13 -        |
| B.3.1. Par voie liquide .....                                                                                                         | - 14 -        |
| B.3.2. En phase gazeuse : le soft-landing .....                                                                                       | - 18 -        |
| <b>C. Le projet iBEAM et le transfert moléculaire .....</b>                                                                           | <b>- 20 -</b> |
| C.1. Interactions entre les ions et la matière et émission moléculaire .....                                                          | - 20 -        |
| C.2. Le projet iBEAM .....                                                                                                            | - 21 -        |
| C.3. Objectifs de ce mémoire et méthodologie associée .....                                                                           | - 22 -        |
| <b>Partie II : Matériel et méthodes .....</b>                                                                                         | <b>- 23 -</b> |
| <b>D. Elaboration des échantillons de références .....</b>                                                                            | <b>- 23 -</b> |
| D.1. Le traitement Piranha .....                                                                                                      | - 24 -        |
| D.2. Le traitement UV-ozone .....                                                                                                     | - 24 -        |
| D.3. Elaboration des échantillons de référence par adsorption forcée de matière au moyen de la technique du <i>spin-coating</i> ..... | - 25 -        |
| <b>E. Techniques analytiques utilisées pour l'analyse de <i>wafers</i> et d'échantillons de référence .....</b>                       | <b>- 25 -</b> |
| E.1. Mesure de l'angle de contact .....                                                                                               | - 25 -        |
| E.2. Mesure de l'épaisseur de couches minces par ellipsométrie .....                                                                  | - 26 -        |
| E.3. Caractérisation de surface par ToF-SIMS .....                                                                                    | - 31 -        |
| E.3.1. Principe théorique de la mesure .....                                                                                          | - 31 -        |
| E.3.2. Appareillage .....                                                                                                             | - 33 -        |
| E.3.3. Analyse spectrale ponctuelle .....                                                                                             | - 34 -        |
| E.3.4. Acquisition des données par imagerie SIMS ( <i>SIMS imaging</i> ou <i>SIMS scanning</i> ) .....                                | - 35 -        |
| E.3.5. Principes et application de l'analyse multivariée (PCA) .....                                                                  | - 37 -        |
| <b>F. Transfert moléculaire au moyen de faisceaux de clusters ionisés .....</b>                                                       | <b>- 38 -</b> |
| F.1. Préparation des cibles et des collecteurs .....                                                                                  | - 38 -        |
| F.2. Mise en œuvre du transfert moléculaire .....                                                                                     | - 38 -        |
| <b>Partie III : Résultats et discussion .....</b>                                                                                     | <b>- 41 -</b> |
| <b>G. Influence du traitement de nettoyage appliqué sur les <i>wafers</i> de silicium .....</b>                                       | <b>- 42 -</b> |
| G.1. Mesure de l'angle de contact .....                                                                                               | - 42 -        |
| G.2. Évaluation de la qualité de nettoyage des <i>wafers</i> de silicium par ellipsométrie .....                                      | - 43 -        |

|                    |                                                                                                                                                                                                 |               |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| H.2.               | Analyse spectrale des échantillons par ToF-SIMS.....                                                                                                                                            | - 45 -        |
| <b>I.</b>          | <b>Comparaisons entre les résultats obtenus par analyse au moyen du faisceau de <math>\text{Bi}_5^+</math> issus du transfert moléculaire au moyen des 3 différents types de faisceau .....</b> | <b>- 51 -</b> |
| I.1.               | Evaluation de la matière transférée d'un point de vue semi-quantitatif au moyen de l'analyse spectrale .....                                                                                    | - 51 -        |
| I.2.               | Evaluation de la matière transférée au moyen de l'analyse multivariée effectuée sur les données spectrales récoltées .....                                                                      | - 54 -        |
| I.3.               | Conclusions sur l'adéquation de chacun des faisceaux de transfert .....                                                                                                                         | - 60 -        |
| <b>Partie IV :</b> | <b>Conclusions et perspectives.....</b>                                                                                                                                                         | <b>- 61 -</b> |
|                    | Conclusions.....                                                                                                                                                                                | - 61 -        |
|                    | Perspectives .....                                                                                                                                                                              | - 62 -        |
|                    | <b>Bibliographie, source des Figures et liens internet.....</b>                                                                                                                                 | <b>- 63 -</b> |

## Quelques remerciements

La réalisation de ce mémoire a été rendue possible grâce à l'aide et la confiance et le soutien qui m'ont été accordés par des nombreuses personnes que je me dois de mentionner ci-dessous.

Je remercie tout d'abord les professeurs Christine Dupont et Arnaud Delcorte, qui ont encadré mon travail durant près de 9 mois, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs capacités à m'aiguiller dans certains moments de doute, mais également à me conforter dans les choix qui permettaient d'atteindre l'objectif voulu. Leur expertise m'a permis d'évoluer tout au long de projet de longue haleine, mais également de perfectionner voire de découvrir certaines compétences qui ne sont pas toujours révélées lors d'un cours en auditoire.

L'utilisation des nombreuses techniques utilisées dans ce mémoire m'a été enseignée par une série de membres issus du personnel technique et scientifique. Madame Delphine MAGNIN et Monsieur Claude POLEUNIS ont respectivement participé à mon initiation vis-à-vis de l'ellipsométrie et de la technique ToF-SIMS, très fréquemment utilisée durant cette année.

D'une manière générale, je remercie l'ensemble des membres des étages C.2 et C.3 du bâtiment Lavoisier, dans lequel j'ai passé de très agréables moments en dehors de ceux consacrés à la réalisation de ce travail. Il m'a été très agréable de partager avec eux les pauses de midi, durant lesquels la bonne humeur ponctuée de nombreux fous rires a régné en maître.

Je remercie enfin toutes les personnes, qui ne font pas partie intégrante de l'unité IMCN, qui m'ont soutenues durant la réalisation de ce travail mais également depuis mon arrivée au sein de la faculté des bioingénieurs, il y a déjà près de 8 ans.

## Partie I : Mise en contexte et objectifs du mémoire

Depuis l'essor des manufactures apparues lors des Grandes Révolutions Industrielles jusqu'à la deuxième moitié du 20<sup>e</sup> siècle, le monde de la production industrielle était d'une opinion commune divisée en deux domaines distincts : l'un était destiné à la transformation de matériaux issus des profondeurs de la Terre (métaux, minéraux, pétrole, charbon, etc.), tandis que l'autre avait pour objet la production (ou l'imitation de la production) de certaines substances synthétisées originellement par les êtres vivants.

Mais durant les précédentes décennies, des recherches commanditées par les secteurs industriel et scientifique ont œuvré pour une atténuation toujours plus forte de cette frontière qui existait jadis entre les objets du monde vivant et ceux du monde « inerte ». En effet, les besoins humains incitent de manière perpétuelle à faire ressembler la matière inerte à de la matière vivante (par exemple, l'implantation d'organes artificiels chez un patient en vue de remplacer un tissu défectueux) ou, *a contrario*, de conférer à la matière vivante des propriétés attribuables à la matière inerte (par exemple, renforcer voire remplacer une partie de l'ossature humaine par l'utilisation de prothèses en céramique, en métal de diverse nature ou en matériau synthétique). De manière à concilier les propriétés issues de la matière vivante et celles attribuables à la matière inerte, les chercheurs ont mis au point des stratagèmes utilisant dans de très nombreux cas des films minces de biomolécules (des protéines, en particulier) adsorbés à la surface de la matière inerte.

La *biotechnologie* est définie par l'OCDE comme l'ensemble des « applications de la science et de la technologie à des organismes vivants ou à leurs composantes, produits ou modélisations dans le but de modifier des matériaux, vivants ou inertes, à des fins de production de connaissances, de biens ou de services » [1]. En vue d'élaborer ces outils, toute une série de techniques, dont une liste non-exhaustive sera présentée dans la suite de ce chapitre introductif, ont été développées de façon à produire ces matériaux inertes dopés à l'aide de molécules issues de la matière vivante.

Ce mémoire, qui s'inscrit dans le cadre d'un groupe de recherche appelé *iBeam*, a pour but d'apporter une contribution académique au développement d'une nouvelle méthode permettant l'élaboration de films minces de protéine adsorbés à la surface de différents matériaux. Le principe de cette méthode sera également présentée à la fin de cette section introductive.

Cependant, avant de développer les différentes méthodes permettant la réalisation de telles couches, nous allons entamer cette mise en contexte par une énumération non-exhaustive de quelques généralités concernant les protéines. Ces considérations vont ensuite permettre de comprendre les principaux enjeux qui accompagneront la mise au point de la méthode que nous souhaitons mettre en œuvre.

## A. Généralités sur les peptides et les protéines

Parmi les nombreuses classes de biomolécules, les protéines en constituent l'une des plus importantes. Celles-ci exercent une grande variété de rôles au sein d'un organisme vivant : elles contribuent à la constitution de la matière vivante (protéines structurelles telles que l'albumine de l'œuf ou la kératine (des ongles, des cheveux et de la peau) ; elles possèdent également des fonctions essentielles pour la croissance et le développement des êtres vivants (hormones, ...) ; elles leur permettent d'interagir avec l'environnement extérieur (adhésion à des supports, ...) ou au contraire de s'en protéger (anticorps, bactériocines, ...).

### A.1. Acides aminés et structure primaire

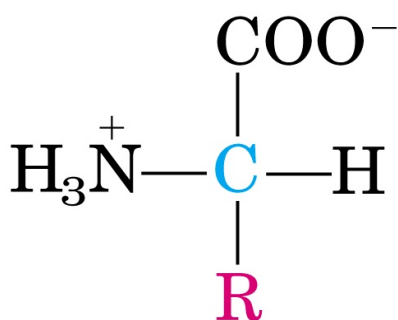


Figure 1 : Structure chimique générale d'un acide aminé [2]

Les protéines sont des polymères organiques formés d'entités résiduelles appelées « acides aminés ». Un acide aminé est composé d'un carbone central chiral sur lequel est greffé un atome d'hydrogène (H), un groupement amine ( $\text{NH}_3^+$ ), un groupement carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) et une chaîne latérale R de nature variable (Figure 1). Un acide aminé libre, en solution aqueuse à pH neutre, est donc une espèce chimique qui possède simultanément des charges formelles positives et négatives, ce que l'on dénomme par le terme de « zwitterion ».

Les 20 différents acides aminés se différencient entre eux par la nature de leur chaîne latérale R qui peut posséder des propriétés physicochimiques différentes. On distingue parmi elles :

- Les chaînes latérales aliphatiques (non polaires), comme dans le cas de l'alanine, la valine, la phénylalanine, etc.
- Les chaînes latérales polaires, non chargées, comme la cystéine, la sérine ou encore l'asparagine ;
- Les chaînes latérales polaires chargées positivement à pH physiologique : la lysine, l'arginine et l'histidine
- Les chaînes latérales polaires chargées négativement à pH physiologique : l'aspartate et le glutamate

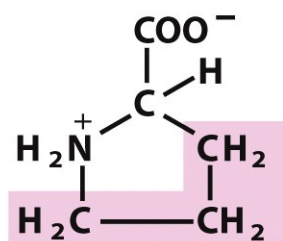


Figure 2 : Structure chimique développée de la proline P [2]

Parmi les acides aminés comprenant une chaîne R aliphatique, mentionnons la particularité de la proline pour laquelle la chaîne latérale R et la partie amine  $\text{NH}_3^+$  forment à elles-deux un hétérocycle azoté (Figure 2).

Il est d'usage commun de dénommer les acides aminés selon un symbolisme en une lettre majuscule ou encore en un triplet de lettres. Dans la littérature, ce symbolisme est utilisé pour décrire la structure primaire des protéines : à

titre d'exemple, la structure primaire de l'angiotensine II humaine pourra s'écrire *Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe* ou encore plus simplement *DRVYIHPF*.

On appelle « structure primaire » la succession des acides aminés formant une chaîne que l'on appellera « peptide » dans la suite de ce travail. En effet, les groupements amine et carboxyle des acides aminés peuvent être liés entre eux au moyen d'une réaction de condensation, menant à la libération d'une molécule d'eau  $H_2O$  (Figure 3) et à la formation d'une nouvelle liaison C-N que l'on appelle « liaison peptidique ». La réaction inverse à la condensation s'appelle une hydrolyse et peut éventuellement être assistée par une classe particulière de protéines, les protéases, appartenant elle-même à la grande famille des enzymes que nous évoquerons un peu plus bas.

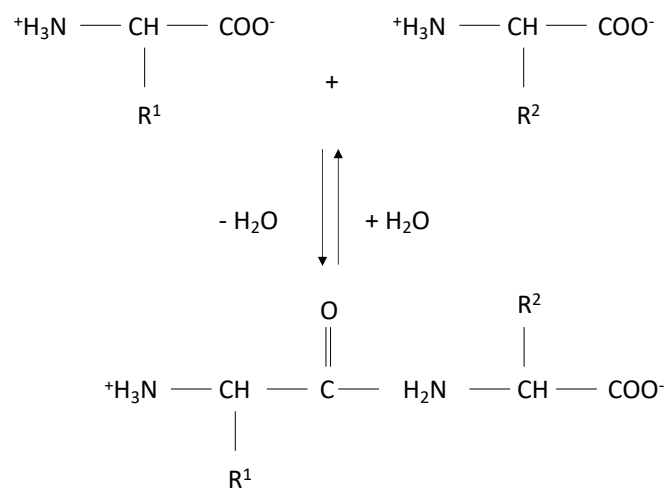


Figure 3 : Formation et hydrolyse d'un lien peptidique entre 2 acides aminés (adapté de [2])

## A.2. Conformation : structures secondaire, tertiaire et quaternaire

### A.2.1. Définitions

La structure primaire des protéines, comme nous l'avons vu lors de la section précédente, concerne la succession des acides aminés constituant la chaîne peptidique. Les structures secondaire et tertiaire d'une protéine concernent l'agencement des acides aminés dans l'espace. Cet agencement est encore appelé *conformation* (Figure 4).

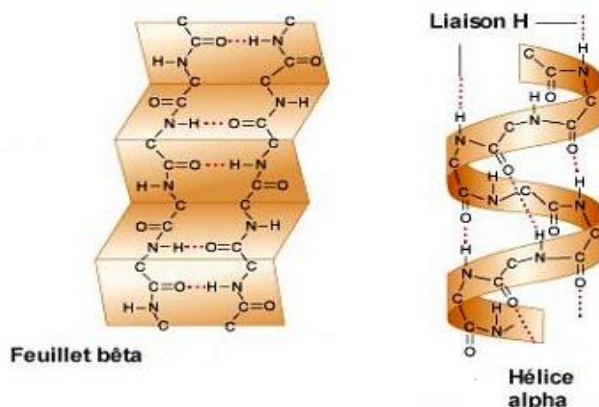


Figure 4 : Types de structure secondaire d'une chaîne peptidique et illustration du pont hydrogène [3]

Une protéine peut, selon les conditions du milieu dans laquelle elle se trouve (force ionique, pH, température, potentiel d'oxydoréduction, ...), se présenter sous plusieurs formes tridimensionnelles différentes que l'on appelle *conformations*. Les différentes conformations pouvant être prises par une protéine sont stabilisées par des liaisons faibles et non-covalentes

(ponts hydrogène dans le cas des protéines), mais également par des liaisons de type covalentes telles que des ponts disulfures.

Un quatrième niveau de structure concerne les interactions entre les chaînes peptidiques formant une protéine (le cas échéant), appelées individuellement « sous-unités ». Une protéine peut, dans certains cas, être constituée d'une seule sous-unité (c'est le cas pour le lysozyme que nous allons présenter prochainement), ou bien être le résultat d'un ensemble de sous-unités en interaction. Les sous-unités formant une protéine peuvent être semblables ou différentes : on parle alors d'homopolypeptides (exemple : dimère de BSA) ou d'hétéropolypeptides (par exemple : l'hémoglobine composée de 2 sous-unités  $\alpha$  et de 2 sous-unités  $\beta$ , ou encore l'insuline qui possède une chaîne a et une chaîne b (Figure 5)) dans le cas contraire.



Figure 5 : Représentation schématique de l'insuline humaine et liaisons disulfures entre des résidus Cys d'une même chaîne peptidique ou de deux sous-unités différentes d'une polyprotéine [4]

Les liaisons entre des chaînes peptidiques différentes (polyprotéines – niveau quaternaire) ou entre les chaînes latérales de résidus aminés d'une même chaîne polypeptidique (protéines globulaires – niveau tertiaire) sont réalisées par des liaisons de type disulfure au niveau de résidus cystéine (ces deux cas de figure sont également représentés dans la Figure 5 ci-dessus). Des ponts hydrogène ainsi que d'autres types d'interactions faibles entre atomes interviennent également dans le maintien de cette structure tridimensionnelle.

#### A.2.2. Conformation native et dénaturation

Les protéines sont formées par les cellules au niveau du cytosol, par l'action des ribosomes. Il est évident que la plus grande partie des protéines formées à ce niveau-ci sont des protéines fonctionnelles, ayant une conformation définie (dite native). Une protéine formée au niveau d'une cellule est donc prédisposée à fonctionner dans les conditions cellulaires natives.

Cependant, lorsque cette protéine est contrainte à des conditions environnementales différentes (de température, de pH, de potentiel d'oxydoréduction, ...), il se peut qu'elle perde cette conformation native. On parle alors de *dénaturation*, pouvant être réversible dans certains cas, tandis qu'elle ne se re-naturera pas dans d'autres. Si la dénaturation est réversible, la protéine reprendra la conformation native une fois que le milieu dans lesquelles elle se trouve le lui permette. En revanche, il arrive fréquemment (lorsque des températures élevées sont atteintes, par exemple) que des liaisons chimiques soient modifiées de manière irréversible, menant à une perte de la conformation native : c'est le cas, par exemple, lorsque l'on cuit l'albumine de l'œuf.

Dans une vaste majorité des cas, ce phénomène est associé à la perte de fonction des protéines. Il existe cependant une classe particulière de protéines qui acquièrent leur fonction au moyen de leur dénaturation. Cette acquisition de fonction est due à la modification de la structure tridimensionnelle de celle-ci, qui permet l'exposition de sites « cryptiques » pouvant sous des conditions dénaturantes interagir avec un ligand. Cela est particulièrement utile pour enclencher des mécanismes biologiques de protection contre une situation défavorable ou la présence d'une substance nocive pour l'organisme.

La conformation et l'intégrité des protéines seront des aspects qui prennent une importance de grande ampleur lorsque l'on considère les enzymes, que nous allons maintenant présenter.

### A.3. Le cas des enzymes

Parmi l'immense variété de fonctions attribuables aux protéines, une partie d'entre-elles permettent d'accélérer grandement une série de réactions chimiques ou métaboliques, pour autant que l'état d'équilibre thermodynamique permette à celles-ci de se produire. Les espèces chimiques capables d'une telle action sont désignées par le terme de « catalyseurs », le terme « enzymes » étant réservé aux catalyseurs de type organique (c'est le cas des protéines, qui représentent la plus grande partie des enzymes).

Les enzymes (et les catalyseurs, par extension), peuvent être caractérisées par leur activité spécifique. Nous entendons par *activité* le nombre de moles (par volume) de réactifs (appelés aussi *substrat*) transformés par l'action de l'enzyme en un délai déterminé. Cette activité dépend des conditions physicochimiques du milieu et de la quantité d'enzyme présente en solution, pour autant que la concentration en substrat soit suffisante que pour lui permettre d'agir de façon optimale. La *spécificité* d'une enzyme se réfère à sa capacité de distinction entre le substrat (ou une combinaison de substrats) désiré(e) et d'autres substrats (appelés compétiteurs ou inhibiteurs). Une enzyme hautement spécifique n'utilisera donc majoritairement qu'un seul type de substrat (ou qu'une seule combinaison de substrats).

La sélectivité d'une réaction chimique (enzymatique) se réfère, elle, à la proportion de produits d'intérêt obtenus par rapport aux autres produits (secondaires) qui peuvent potentiellement apparaître lors de réactions impliquant les mêmes espèces chimiques (dû à des réactions parallèles, ou à des réactions consécutives qui transformeraient le produit d'intérêt en d'autres produits sous l'action de la même enzyme).

### A.4. Molécule modèle utilisée dans ce mémoire : le lysozyme d'œuf de poulet

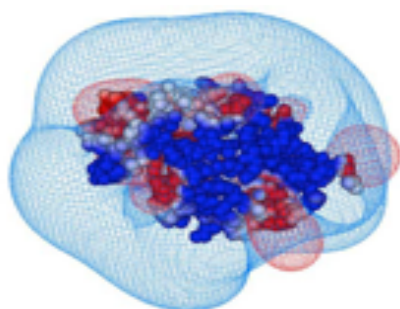


Figure 6 : Structure tridimensionnelle du lysozyme du blanc d'oeuf de poulet [5]

Dans le cadre de ce mémoire, les expériences et les résultats en découlent ont été réalisées avec un seul type de protéine : le lysozyme du blanc d'œuf de poulet (Figure 6). Aussi appelé *muramidase*, il s'agit d'un peptide globulaire composé d'une seule chaîne peptidique de 130 résidus aminés et ayant une masse moléculaire de 14.300 Da [6],[7]. Dans des conditions physiologiques normales, sa structure globulaire est stabilisée par l'action de 4 ponts disulfures.

Le lysozyme participe à la lutte contre les bactéries endogènes de l'œuf grâce à son activité enzymatique de type hydrolase qui coupe les peptidoglycanes contenus dans la paroi des cellules bactériennes au niveau des liaisons  $\beta$ -1,4 entre un résidu *acide N-acétylmuramique* et un résidu *acide N-acétylglucosamine* (Figure 7).

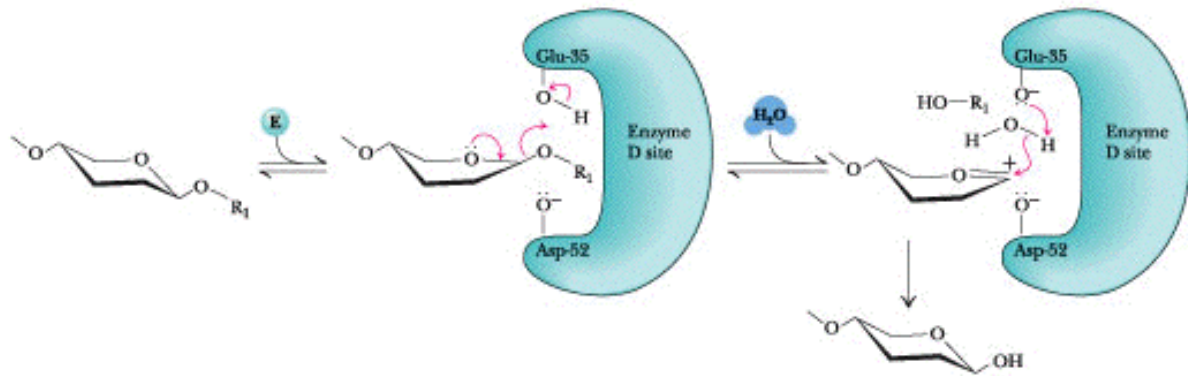


Figure 7 : Hydrolyse du peptidoglycane par l'action du lysozyme d'oeuf de poulet [8]

## B. Élaboration de couches minces de biomolécules

La compréhension des mécanismes chimiques et physiques permettant la création de couches minces à la surface d'un objet nécessite le rappel de quelques concepts théoriques que nous allons développer dans cette section.

Par la suite, une énumération non-exhaustive de quelques techniques couramment utilisées en industrie ou en recherche scientifique sera dressée. Pour chacune d'entre-elles, nous allons discuter les différents avantages et inconvénients liés à leur mise en œuvre. Cette partie nous permettra également de montrer la vaste gamme d'applications dérivées de ces couches minces protéiques.

Cette section fera office de transition vers la section C, au cours de laquelle la méthode d'élaboration de couches minces de protéines que nous souhaitons étudier dans le cadre de ce mémoire sera présentée.

### B.1. Introduction aux interactions moléculaires interfaciales

Une interface peut être définie comme la frontière séparant deux phases distinctes. Il peut notamment s'agir d'une surface qui sépare un milieu liquide d'un milieu solide, deux phases liquides immiscibles ou encore un solide adsorbé à la surface d'un autre solide (telles les couches minces de biomolécules que nous souhaitons construire).

Dans ce cadre, l'eau et les biomolécules sont des composés pouvant interagir de diverses manières vis-à-vis d'une surface. Cette interaction est la résultante, d'une part, des forces qui existent entre des molécules identiques (cohésion) et, d'autre part, des forces qui agissent à l'interface entre des molécules de nature différente (adhésion) [9].

### B.1.1. Interaction entre une goutte liquide et une surface solide

Lorsqu'une goutte liquide est déposée à la surface d'un support solide, elle va adopter une forme tridimensionnelle différente selon les propriétés des deux différentes phases. Dans certains cas, elle va s'étaler sur toute la largeur de la surface de manière à former un film très mince ; dans d'autres cas, elle va former une structure plus sphérique, de manière à minimiser l'interface qu'elle partage avec le solide (Figure 8). Ces deux phénomènes distincts sont dus à des forces d'interaction agissant sur une interface qui tendent à diminuer l'aire de celle-ci, ce que l'on dénomme par le terme de « tension superficielle », symbolisé par la lettre grecque  $\gamma$  [10].

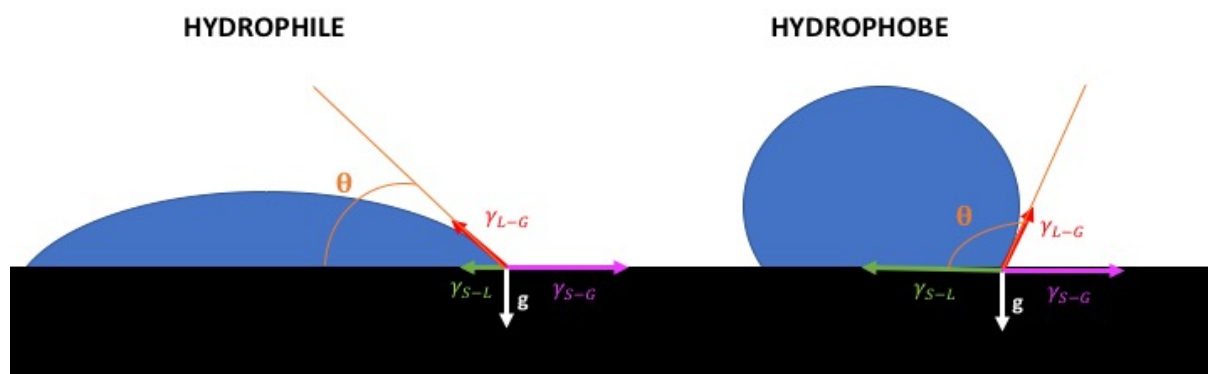


Figure 8 : Illustration du concept de mouillabilité d'une surface

Dans le développement qui suit, on notera respectivement par  $\gamma_{s-g}$ ,  $\gamma_{s-l}$  et  $\gamma_{l-g}$  les tensions superficielles des interfaces solide-gaz, solide-liquide et liquide-gaz.  $\theta$  désignera la mesure de l'angle formé par la goutte entre les interfaces solide-liquide et liquide-gaz au point où les trois phases se rencontrent. Cet angle est appelé *angle de contact* et est lié aux différentes formes de la tension superficielle par l'équation de Young (éq. 1) :

$$\gamma_{l-g} * \cos(\theta) = \gamma_{s-g} - \gamma_{s-l} \quad (\text{éq. 1})$$

$\gamma_{l-g}$  et  $\gamma_{s-g}$  n'étant pas des variables sur laquelle il est possible d'avoir un contrôle sans changer les propriétés du liquide ou du gaz (température, composition, ...), seule la norme du vecteur  $\gamma_{s-l}$  aura une influence sur l'angle de contact, comme le montre l'équation 1. Un angle de contact  $\theta$  élevé sera observé lorsque la tension superficielle  $\gamma_{s-l}$  qui tend à diminuer la surface de l'interface s-l le sera également, et réciproquement sera plus fermé lorsque cette tension superficielle sera plus petite que  $\gamma_{s-g}$ .

### B.1.2. Adsorption d'une protéine sur une surface

Une adsorption est définie comme l'accumulation spontanée d'une substance dans la zone interfaciale séparant deux phases. Cette accumulation est due à deux types de phénomènes distincts que nous allons définir ci-dessous : la physisorption et la chimisorption.

La physisorption résulte principalement d'interactions faibles, de type électrostatique, entre différents atomes appartenant à des molécules différentes. Dans notre cas, il s'agira des interactions entretenues par les protéines vis-à-vis de la surface sur laquelle elles s'adsorbent.

Ces interactions faibles peuvent être de différents types : des ponts Hydrogène, des forces de Van Der Waals, ...

La chimisorption implique, quant à elle, des liaisons chimiques covalentes entre les constituants des deux phases. Dans le cas d'un *wafer* de silicium, il s'agira d'une liaison chimique covalente entre un groupement silanol déprotoné ( $\text{Si-O}^-$ ) et une extrémité de la protéine chargée positivement (par exemple une amine terminale ou un groupement R chargé positivement (Lysine, Arginine ou Histidine – à pH 7). La chimisorption est une technique permettant de créer des couches très minces de matière, pouvant même être constituées d'une seule couche de biomolécules (monocouches de Langmuir).

Selon l'hydrophilicité de la surface et la nature des chaînes latérales des acides aminés qui la composent, la protéine va adopter une structure tridimensionnelle lui permettant de maximiser les interactions attractives qu'elle peut entretenir avec la surface et minimiser les interactions plus défavorables. Pour une protéine déposée sur une surface chargée négativement, les acides aminés possédant des chaînes latérales chargées positivement auront tendance à s'orienter de manière à maximiser les interactions qu'ils entretiennent avec la surface. En revanche, il existe des acides aminés possédant une chaîne latérale apolaire ou chargée négativement. La protéine va donc adopter une conformation lui permettant de maximiser la distance entre ces chaînes latérales et les charges négatives de surface du support.

Certaines portions de protéines contenant un grand nombre de résidus apolaires ou chargés négativement entretiendront dès lors des interactions répulsives avec la surface et émergeront de celles-ci en formant des structures en forme de queues, d'hélices ou encore de boucles (Figure 9).

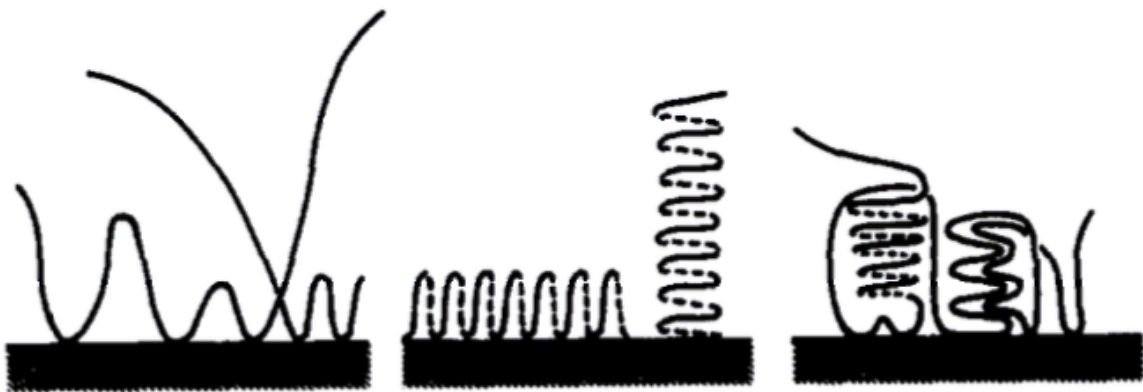


Figure 9 : Différentes conformations pouvant être prises par une protéine une fois adsorbée à une surface [16]

## B.2. Intérêts de l'élaboration de couches minces protéiques

L'élaboration des couches minces de biomolécules (telles que des protéines) ouvre la voie à de nombreuses applications dans des domaines variés, que ce soit en recherche scientifique ou en fabrication d'appareillages à vocation biotechnologique. Nous allons ici en donner quelques exemples.

### B.2.1. Test ELISA

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique courante au sein des industries pharmaceutiques et en recherche scientifique. Elle permet la détection et la quantification d'anticorps ou d'antigène au sein d'un sérum biologique.

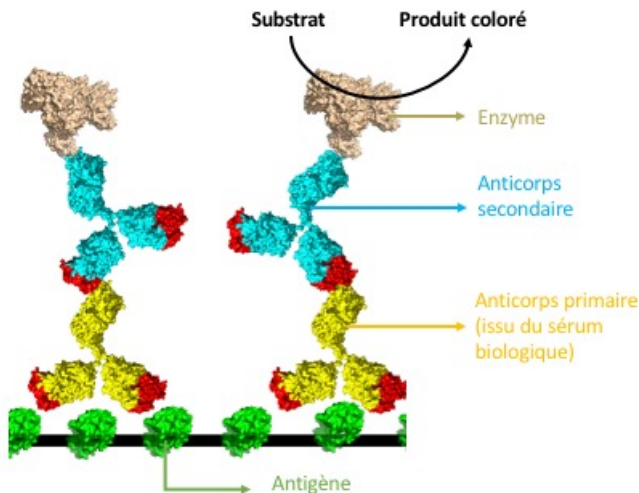


Figure 10 : Schéma de principe du test ELISA indirect [11]

l'origine incolore (exogène au milieu biologique d'origine) en un produit coloré (Figure 10). Tout anticorps qui n'a pas été fixé à ce stade sera éliminé lorsque l'on videra les puits du liquide qu'ils contiennent.

Par la suite, une solution contenant le substrat chromophore est ajoutée dans les puits, de manière à initier l'apparition de la couleur due à l'activité de l'enzyme. Cette coloration n'apparaîtra donc que dans le cas où l'anticorps primaire issu du sérum aura fixé l'anticorps secondaire sur lequel l'enzyme est liée. L'intensité de coloration de la solution peut, par ailleurs, servir à une quantification de cet anticorps primaire au moyen d'un dosage par colorimétrie.

### B.2.2. Les biocapteurs

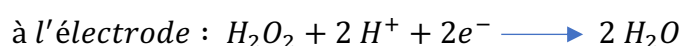
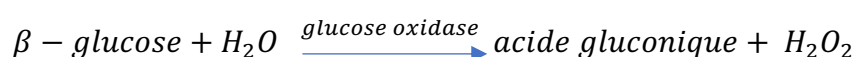
Un biocapteur est un dispositif technologique capable de fournir une information (semi-) quantitative sur la présence d'une substance particulière au sein d'un organe, d'un organisme vivant ou d'un écosystème grâce à la reconnaissance de cette substance par un élément d'origine biologique [12]. Cet appareil est couplé à un système électronique permettant de traduire la reconnaissance de la substance par le récepteur adéquat en une information pouvant être traitée par un appareil électronique.

#### Exemple d'application dans le milieu médical : le biocapteur de glucose

Un exemple typique est le biocapteur de glucose, servant à mesurer le taux de glucose sanguin [13]. Celui-ci est composé d'une électrode pouvant être de nature diverse (carbone vitreux, platine, ...) sur laquelle est déposée une fine couche d'un mélange composé de l'enzyme *glucose oxidase* et d'un polymère conducteur (polypyrrole), servant de liant afin de maintenir

l'intégrité de la couche et de permettre le transport des électrons à travers le revêtement. Ce mélange est obtenu par électro-polymérisation du pyrrole au sein duquel sera séquestré l'enzyme.

La *glucose oxidase* est une enzyme qui transforme le glucose en acide gluconique, la réaction étant accompagnée d'une réduction de l'eau en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est une substance fortement oxydante qui va réaliser une réaction d'oxydoréduction avec une électrode, créant ainsi un courant électrique pouvant être mesuré à l'aide d'un ampèremètre. Au courant mesuré à l'électrode pourra ensuite être associée une teneur en glucose dans le sang.



### Amélioration de la biocompatibilité des matériaux à des fins médicales

Outre des enzymes, il est également possible de réaliser des revêtements constitués d'une couche mince de protéines de manière à améliorer la biocompatibilité de certains objets tels que des prothèses. Un brevet utilisant une protéine de structure, dite « ostéogénique » (d'après la dénomination utilisée par celui-ci) facilitant l'ostéointégration d'une prothèse dentaire en titane a notamment été déposé [14].

### Gestion environnementale

De nombreux appareils ont été développés de manière à détecter des changements au sein d'un organisme ou d'un écosystème [12]. Il existe par exemple des capteurs enzymatiques, fonctionnant de manière semblable au biocapteur de glucose, qui permettent de détecter et de mesurer la présence de substances toxiques telles que des perturbateurs endocriniens.

### Amélioration de la stabilité microbienne dans les conserves alimentaires

L'efficacité d'un revêtement à base d'une substance bactéricide de type protéique (nisine) sur la surface interne des conserves alimentaires a été étudiée [15] de manière à améliorer la conservation des denrées qu'elles contiennent.

La nisine est un bactéricide habituellement produit au cours de la fermentation lactique par certaines bactéries de type LAB (*Lactic Acid Bacterium*), et a pour but d'empêcher la prolifération de microorganismes pouvant agir comme rivaux vis-à-vis de ce *Bacillus*.

#### B.3. Techniques fréquemment utilisées pour l'élaboration de couches minces de biomolécules

Il existe de nombreuses techniques permettant d'obtenir des couches protéiques adsorbées à des surfaces. Nous allons en évoquer ci-dessous quelques exemples, et discuter des avantages et inconvénients liés à ces méthodes.

### B.3.1. Par voie liquide

#### Formation d'une monocouche adsorbée par trempage au sein d'une solution protéique, ou étalement mécanique suivi d'un retrait du solvant par séchage (forcé ou non)

Pour la constitution de revêtements à base de nisine [15], la couche protéique est adsorbée à la surface d'un film de polyéthylène (ou de cellulose) par trempage pendant quelques heures dans une solution protéique. Cette surface est ensuite séchée à l'air.

Une autre manière évoquée dans cet article est l'étalement mécanique de la solution au moyen d'un étaleur triangulaire. Le film est ensuite séché grâce à un flux d'air chaud qui permet une meilleure répartition des protéines sur la surface.

#### Dépôt d'une goutte de solution protéique et séchage à l'air libre (ou par flux)

Il est à noter que pour cette méthode de dépôt, l'entièreté de la matière sera adsorbée au support. Selon la quantité de solution protéique déposée sur le support, il est possible au moyen de cette technique d'obtenir des couches de matière plus ou moins épaisses. Toutefois, dans le cas d'une couche très épaisse, il est probable que les couches obtenues soient très inhomogènes, menant à une interface solide-air pouvant être très rugueuse.

#### Formation d'une monocouche par chimisorption

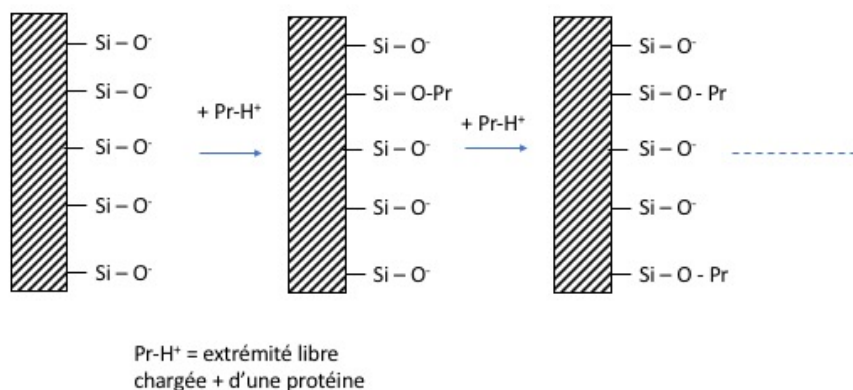


Figure 11 : Illustration de l'application du modèle de la monocouche de Langmuir à une protéine (Pr) adsorbée à la surface d'un wafer de silicium

Une surface d'adsorption est typiquement recouverte d'un nombre défini de sites (Figure 11) sur chacun desquels peuvent se fixer un ligand. Le modèle de Langmuir, qui explique ce phénomène de chimisorption d'une espèce chimique libre en solution sur une surface homogène, est définie par un modèle qui se base sur les hypothèses suivantes :

- Les sites sont équivalents et indépendants entre eux, ce qui signifie que les probabilités d'adsorption du ligand est égale pour tous les sites (Si-O<sup>-</sup>) disponibles ;
- Il y a un nombre défini de sites ;

- Le ligand (ici, une protéine symbolisée par « Pr ») ne peut s'adsorber qu'à un seul site à la fois ;
- Il s'agit d'un processus réversible, qui peut être régi par une constante d'équilibre K.

Il peut être démontré qu'il existe une relation mathématique entre la concentration de la protéine en solution, que l'on note « C », et la fraction de sites liés à ce soluté, que l'on note  $\theta$  :

$$\theta = \frac{KC}{1 + KC}$$

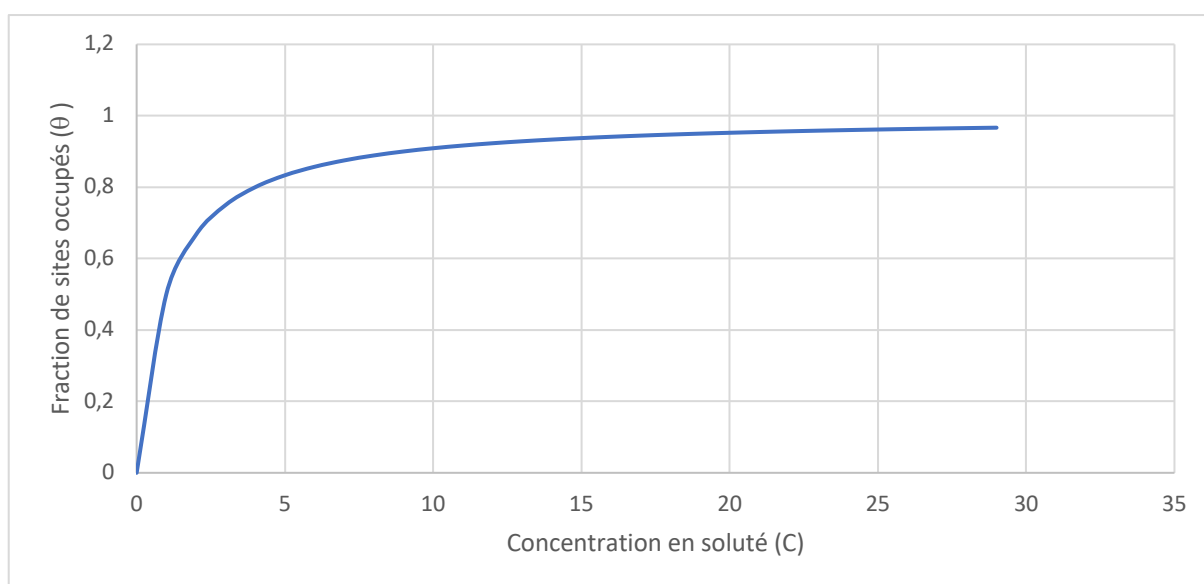


Figure 12 : Représentation d'une Isotherme de Langmuir hypothétique, avec K fixé à une valeur de 1

La relation liant  $\theta$  à C est montrée dans la figure 12 pour un cas hypothétique (K est fixé à une valeur égale à 1). La fraction de sites occupés est donc dépendante de la quantité de solutés présente en solution. Pour des concentrations élevées, c'est-à-dire pour  $C \gg K$ ,  $\theta$  tend vers la valeur de 1, signifiant que l'on obtient une monocouche de Langmuir (c'est-à-dire un système d'interface pour lequel l'ensemble des sites de la surface est lié à un soluté).

Sous certaines conditions cependant, la formation d'une monocouche uniforme sur l'entièreté d'une surface ne se produit pas en raison notamment d'une adsorption préférentielle de protéines présentes en solution sur des protéines déjà liées au support.

#### Adsorption forcée par *spin-coating*

Le *spin-coating* est une technique basée sur l'étalement d'une goutte de solution protéique (ou tout autre type de molécule capable de s'adsorber à une surface) au moyen de la force centrifuge induite par un mouvement de rotation rapide du support autour de lui-même [17]. Lorsque la matière qui n'a pas été adsorbée au support arrive au bord de celui-ci (c'est-à-dire le solvant et l'excédent de soluté qui n'a pas pu être fixée sur le substrat), elle est éjectée sous forme vaporisée en dehors de la surface.

Fig. 5. Film thickness,  $h_f$ , as a function of spin speed and initial polymer solution concentration for PS in xylene: ( $\square$ ) 1 wt% PS and ( $\times$ ) 4 wt% PS. Solid lines are predictions of Eq 5 with parameters given in Table 2.

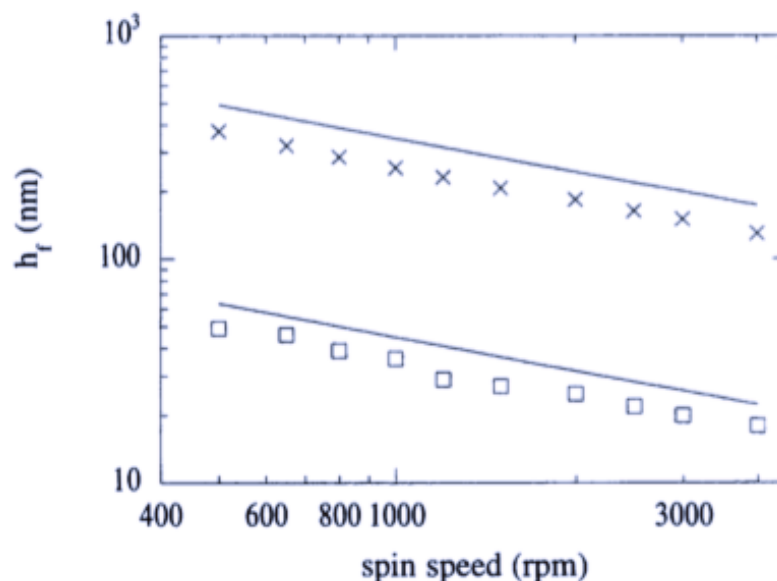


Figure 13 : Influence de la vitesse de rotation du spin-coating et de la concentration de la solution déposée sur l'épaisseur du film de matière formée (extrait de[17])

Le *spin-coating* permet de créer des couches minces donc l'épaisseur dépend principalement de 2 paramètres : la vitesse de rotation du rotor et la quantité de protéine initiale contenue dans la solution déposée. La figure 13 présentée ci-dessus montre l'influence de ces deux paramètres : une quantité élevée de protéines déposée aura tendance à accroître l'épaisseur du film, tandis qu'une vitesse de rotation plus élevée mènera à la formation d'une couche plus fine.

Le *spin-coating* est une technique de déposition forcée qui est facile à mettre en œuvre, mais qui possède toutefois quelques inconvénients. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter la grande difficulté rencontrée à créer des couches d'épaisseur homogène lorsqu'on utilise des solutions possédant une plus grande viscosité (qui dépend du solvant mais aussi de la concentration du soluté lorsque celle-ci est plus élevée). Ce phénomène est dû à un gradient d'accélération centrifuge régnant sur la surface en rotation : en effet, l'accélération centrifuge est proportionnelle à  $r^2$ ,  $r$  étant la distance entre un point donné de la surface considérée et le centre de rotation du support. Puisque  $r$  a une valeur, par définition, plus basse lorsque l'on se rapproche de l'axe de rotation de la surface, l'accélération centrifuge sera donc plus faible à cette position-là. Cela aura donc pour conséquence que l'épaisseur du film aura tendance à être plus élevée au centre de la surface et plus faible lorsque l'on se rapproche des bords de celle-ci. Il peut également y avoir des effets d'accumulation aux bords de la surface.

La figure 14 ci-dessous synthétise les éventuelles difficultés que l'on peut rencontrer lorsque l'on élabore des couches de molécules à l'aide des techniques susmentionnées.

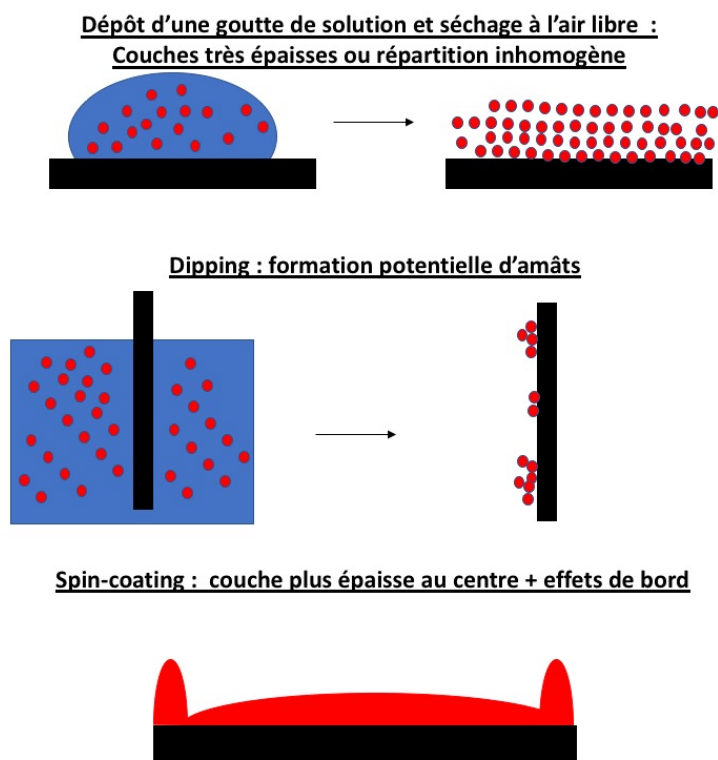


Figure 14 : Schématisation de quelques problèmes potentiels rencontrés lors de l'adsorption de protéines par dépôt d'une goutte de solution, par dipping, ou par spin coating

### Assemblage ELBL (Electrostatic Layer-by-Layer)

L'assemblage Layer-by-Layer est une méthode permettant la construction de couches denses de matière contenant des protéines à la surface d'un support solide. On peut y mentionner comme avantage, par rapport au spin-coating, l'indépendance de la géométrie du support : le spin-coating nécessite l'utilisation de support plan, tandis que la technique ELBL peut également s'appliquer à d'autres formes de supports (sphériques, cylindriques, ...).

Cet assemblage est constitué d'une alternance de couches protéiques et de couches constituées d'un matériau composite dont la surface comporte de nombreuses charges (ce composite est appelé « poly-électrolyte ») [18], [19]. Ce poly-électrolyte peut, selon sa nature, posséder des charges de surface positives ou négatives. Il agira comme agent permettant de maintenir entre-elles les couches successives de protéines.

La figure 15 illustre le principe de construction d'une couche protéique à l'aide d'un assemblage ELBL. En phase liquide, une première couche de protéine va s'adsorber par chimisorption à la surface du support. Ensuite, le support est trempé dans une seconde solution contenant des polyanions, qui vont s'adsorber à la surface supérieure des protéines contenant des charges positives. En immergeant de manière alternée la couche produite dans les solutions contenant soit la protéine, soit le polyélectrolyte, on va augmenter de manière progressive l'épaisseur de la couche jusqu'à ce qu'elle atteigne l'épaisseur désirée.

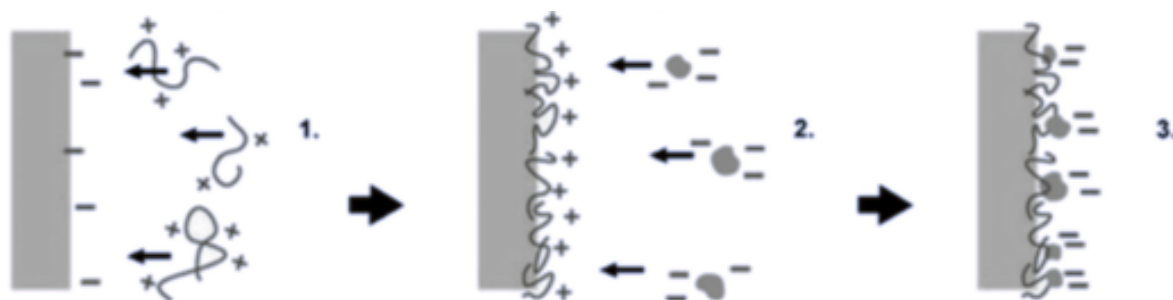


Figure 15 : Principe d'élaboration d'une couche mince alternant des protéines possédant des charges formelles positives et des polyélectrolytes possédant des charges superficielles négatives [18].

### B.3.2. En phase gazeuse : le soft-landing

Les techniques présentées à la section précédente impliquent la présence d'un solvant qui peut, dans certain cas être à l'origine de certaines difficultés potentielles. En effet, le retrait du solvant peut occasionner par exemple un effondrement de la structure de la couche, ou à tout le moins des changements de conformation des protéines.

Le *soft-landing* est défini comme un transfert de molécules intactes depuis une matrice, par volatilisation de celles-ci, suivie par « atterrissage en douceur » sur une surface de manière à conserver l'intégrité de celles-ci [21]. Cette technique a été mise au point de manière à pouvoir modifier les propriétés d'une surface via le dépôt en couches minces de molécules diverses (métaux, biomolécules, etc.).

Cette technique possède de nombreux avantages en comparaison avec d'autres alternatives [22] : la possibilité d'un dépôt d'un seul type de molécule via sélection de la masse (au moyen d'un analyseur de masse) ou encore la possibilité d'effectuer le transfert à pression atmosphérique (là où les autres méthodes requièrent des conditions de vide poussé). L'énergie cinétique de translation des molécules émises par la méthode *soft-landing* est faible (jusqu'à moins d'un eV par molécule), ce qui permet un transfert de molécules intactes, ayant une conformation inchangée [21].

La méthode *soft-landing* utilise un appareillage décrit à la figure 16, composé d'une source d'ionisation ( $EI^1$ ,  $ESI^2$  ou  $MALDI^3$ ), d'un instrument optique permettant de diriger les ions émis dans une direction voulue (quadripôle linéaire) et d'un analyseur de masse (*ion trap*, ToF, ...). La source d'ionisation va permettre la volatilisation des molécules qui vont se trouver sous forme ionisée. Ces ions vont pouvoir ensuite être focalisés et dirigés à l'aide d'un instrument optique comme par exemple, un quadripôle. L'analyseur de masse va permettre de discriminer les molécules que l'on souhaite déposer à la surface selon leur rapport  $m/z$  ( $m$  étant la masse de l'ion et  $z$  symbolisant sa charge).

<sup>1</sup> Electron Ionization

<sup>2</sup> ElectroSpray Ionization

<sup>3</sup> Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

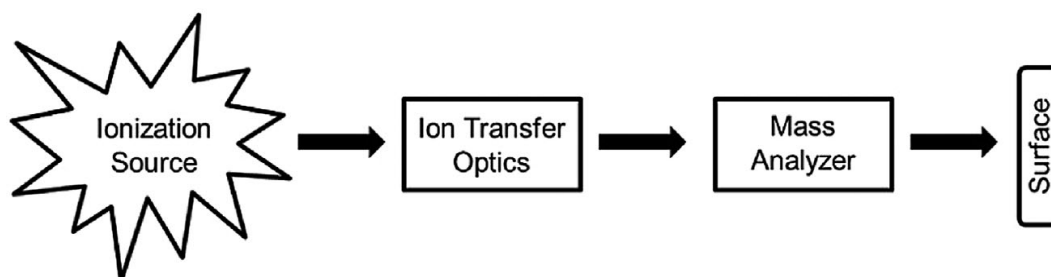


Figure 16 : Principe de la modification d'une surface par soft-landing et instrumentation associée [21]

Lors de l'atterrissage des molécules sur la surface, les propriétés de celle-ci vont également avoir une influence sur le dépôt des molécules (dureté de la surface, mouillabilité, chimisorption, ...). Par exemple, dans le cas d'un *reactive landing*, le dépôt de molécules va être accompagné de la formation de liaisons chimiques covalentes entre la surface et les molécules transférées (chimisorption). Ces liaisons covalentes vont permettre une meilleure stabilisation de la couche déposée. La dureté de la surface va, quant à elle, avoir une influence sur la fragmentation de la molécule au moment de son « atterrissage » sur la surface. Une surface plus dure aura tendance à causer une fragmentation plus importante de la molécule. L'angle d'atterrissage des molécules sur cette surface va également influencer l'adsorption de celles-ci ou leur éventuelle fragmentation.

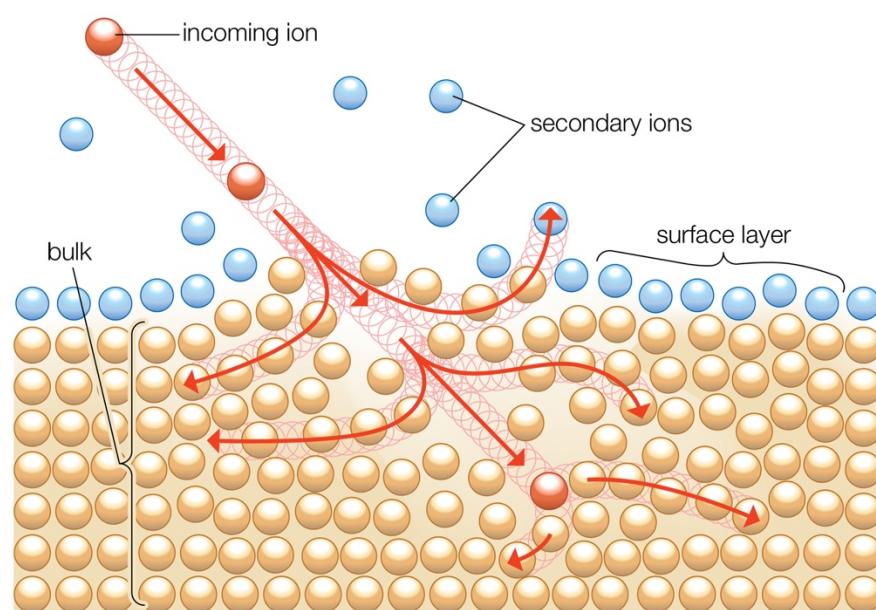
## C. Le projet iBEAM et le transfert moléculaire

### C.1. Interactions entre les ions et la matière et émission moléculaire

Lorsqu'une matrice solide est bombardée par un faisceau d'ions, l'énergie des ions est transférée à la matière qui est ensuite dissipée de plusieurs manières différentes [23] :

- Excitation vibrationnelle des atomes et des liaisons ;
- Cassure de certaines liaisons entre atomes ;
- Transfert d'atomes d'hydrogène ;
- Modification de la structure de la matière avec émission de molécules (ou de fragments) en phase gazeuse.

Pour des faisceaux d'ions monoatomiques, le bombardement de particules primaires sur la matière solide va créer une série de collisions interatomiques en son sein qui vont mener à un réarrangement des molécules et des atomes entre eux (figure 17). Ce mouvement va d'abord être dirigé vers les couches plus profondes de la matière. Ensuite, les collisions vont engendrer une déviation du projectile, ce qui aura pour effet d'entraîner des mouvements de molécules cette fois-ci dirigés vers le haut. Ce seront donc les atomes situés sur la couche supérieure qui seront éjectés. Les particules secondaires seront donc des atomes, des molécules entières ou des fragments de molécule pouvant être neutres ou ionisés. La fraction de d'espèces ionisées (qui seront exploitée en SIMS<sup>4</sup>) est toutefois faible en regard du nombre de molécules éjectée de la matière [26]. La particule primaire va, quant à elle, continuer sa pénétration en ligne droite pendant plusieurs nm de distance [24].



© 2012 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figure 17 : Interaction des particules primaires issues d'un faisceau d'ion avec la matière [25]

<sup>4</sup> Voir section E.3

Lorsque l'on utilise des faisceaux d'ions, il est souvent d'usage d'employer en tant que particules primaires des petites particules multi-atomiques appelées « agrégats » (« *clusters* », en anglais) plutôt que des particules primaires monoatomiques. L'intérêt d'utiliser ces clusters dans un faisceau primaire est d'augmenter le nombre de particules éjectées par rapport à un faisceau d'ions monoatomiques, tout en utilisant une énergie totale identique [24], ce qui a pour effet de limiter la fragmentation des molécules composant la matière bombardée. Cela est dû à une énergie par atome sera proportionnellement réduite par rapport à des ions monoatomique possédant une même énergie cinétique.

A ce stade-ci, il paraît important de mettre en relation les énergies des atomes qui constituent les agrégats et les énergies des liaisons chimiques classiquement retrouvées dans la structure moléculaire d'une protéine (tableau I). En effet, si les énergies cinétiques des atomes constituant les agrégats d'ions primaires sont supérieures à celles qui lient les atomes entre eux, il y a fort à parier que l'interaction des ions primaires avec la matière mènera à une fragmentation élevée de celle-ci. Dans le cas contraire, nous pouvons à priori faire l'hypothèse que des fragments secondaires de taille plus importante seront éjectés.

Tableau I : Energie des principales liaisons entre atomes au sein des chaines latérales des acides aminés [27]

| Liaison chimique | Energie molaire de liaison (kJ/mol) | Energie atomique de liaison (eV/atome) |
|------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| C-C              | 348                                 | 3,61                                   |
| C-H              | 412                                 | 4,28                                   |
| C-O              | 360                                 | 3,74                                   |
| C-N              | 305                                 | 3,16                                   |

De plus, il a été montré que l'émission des particules secondaires était plus reproductible en utilisant un faisceau de cluster d'ions plutôt qu'un faisceau primaire de type monoatomique : cela permet donc une comparaison plus fiable de différents échantillons analysés en SIMS.

## C.2. Le projet iBEAM

Ce mémoire s'inscrit dans un projet de recherche plus vaste mené au travers d'une collaboration entre les équipes des Professeurs Arnaud Delcorte, Christine Dupont et Clément Lauzin. L'approche innovante étudiée dans le cadre de ce projet propose de tester différents types de *clusters* ioniques pour transférer de la matière depuis une cible (sur laquelle a été déposée des protéines en couche épaisse) vers un collecteur. Une vision schématique de cette approche est montrée à la figure 18, page suivante.

Après transfert des biomolécules sur le collecteur, il s'agira de caractériser celui-ci. La technique analytique utilisée à cette fin, l'imagerie SIMS, sera présentée ultérieurement.

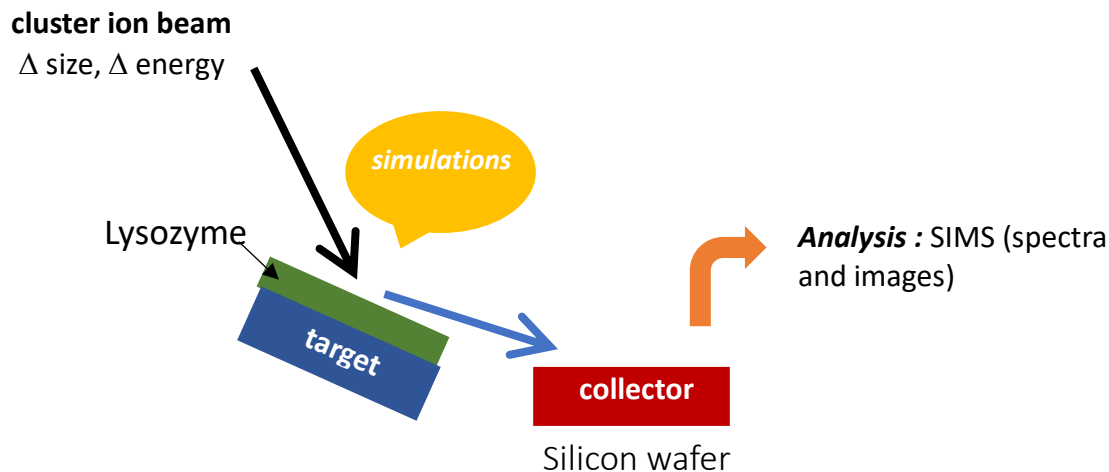


Figure 18 : Stratégie proposée par le projet iBeam pour l'élaboration de couches minces protéiques sur un support appelé "collecteur"

### C.3. Objectifs de ce mémoire et méthodologie associée

Comme évoqué à la section précédente, le choix du faisceau d'agrégats est un facteur d'importance cruciale pour le transfert de biomolécules. Les différents *clusters* utilisés (possédant des énergies cinétiques de grandeur distincte) montreront un comportement distinct vis-à-vis de la matière que l'on souhaite transférer : il y a donc un compromis à trouver, en termes d'énergie cinétique des atomes composant les ions primaires, entre efficacité de la désorption au niveau de la cible et le maintien de l'intégrité de la protéine une fois qu'elle est adsorbée à la surface du collecteur.

L'objectif principal de ce mémoire est donc de définir le type de faisceau de *clusters* ioniques permettant un transfert optimal de protéines depuis la cible vers le collecteur (Figure). A cette fin, différents faisceaux d'agrégats ayant des propriétés énergétiques différentes ont été utilisés pour effectuer des transferts de protéine (ces expériences ont été réalisées avec le lysozyme comme modèle). La quantité de protéine composant le dépôt est également un facteur que l'on a souhaité optimiser.

Une fois le transfert moléculaire effectué, il s'agira de caractériser la matière qui a été transférée et de la comparer à des échantillons de couches minces de protéine, de différentes épaisseurs, fabriqués par dépôt forcé en phase liquide au moyen de la technique du *spin-coating*. En ce qui concerne l'analyse des dépôts, la méthode qui est privilégiée est la technique SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), qui sera développée à la section E.3.4.

Il s'agit d'une technique de choix pour la caractérisation d'un échantillon solide, mais qui génère une quantité importante de données à interpréter. Grâce à l'utilisation de méthodes d'analyse multivariée, et en particulier la PCA (*Principle Components Analysis*), les informations issues des analyses par spectrométrie ToF-SIMS qui décrivent le mieux possible la matière déposée sur les supports de silicium seront identifiées et utilisées de manière à tirer des conclusions sur l'efficacité et la qualité de la matière transférée pour chaque faisceau utilisé (voir section H.2.1)

## Partie II : Matériel et méthodes

Comme évoqué à la fin de la section précédente, les différentes techniques que nous avons utilisées dans le cadre de ce mémoire ont pour objet la caractérisation de couches minces obtenues par adsorption forcée de Lysozyme sur un wafer de silicium cristallin au moyen de la technique du *spin-coating*.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser au substrat sur lequel les couches protéiques seront obtenues. En effet, le nettoyage d'un *wafer* peut nécessiter l'emploi de méthodes de nettoyage pouvant être parfois contraignantes à utiliser. Parmi ces méthodes, le traitement par un mélange Piranha constitue une étape pour laquelle des précautions particulières d'utilisation doivent être prises (en raison de l'extrême corrosivité de ce mélange), et il est intéressant d'en vérifier l'utilité dans le cadre de ce mémoire. Pour ce faire, des mesures d'angle de contact et des mesures d'épaisseur de couche ont été effectuées sur des *wafers* ayant subi différents traitements ou combinaisons de traitements.

Par la suite, des échantillons ont été réalisés en tenant compte des enseignements tirés grâce aux mesures réalisées sur les *wafers* ayant subi les différent(e)s (combinaisons de) traitements. Ces échantillons diffèrent entre eux par la concentration de la solution de lysozyme qui a été déposée à leur surface au moyen du *spin-coating*. Les méthodes utilisées pour la caractérisation de ces couches protéiques sont, une nouvelle fois, l'ellipsométrie à laquelle s'ajoute une méthode analytique de caractérisation de surface : la Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires (SIMS, en anglais).

La technique SIMS est une méthode semi-quantitative générant un nombre important d'informations qui va falloir traiter en vue d'en extraire l'essentiel. La PCA (acronyme anglais de *Principal Component Analysis*) est une technique d'analyse multivariée permettant de réduire la grande quantité d'informations issues de l'analyse spectrale et de pouvoir classer les différents spectres traités selon un nombre réduit de variables. Une explication théorique de cette méthode d'analyse multivariée sera réalisée, suivie en fin de cette section par l'application de la PCA sur les résultats SIMS obtenus pour les échantillons de référence.

Le développement de cette section présentera les différentes méthodes susmentionnées d'un point de vue théorique, et d'un point de vue pratique.

### D. Elaboration des échantillons de références

Le nettoyage des *wafers* de silicium est un élément déterminant la manière dont les protéines se disposent sur ce support (cet aspect sera discuté dans la section G). En effet, les protéines vont interagir avec le support grâce à des interactions de type hydrophile, par l'intermédiaire de leurs chaînes latérales R et de leurs extrémités. Un support plus hydrophile permettra une adhésion *a priori* plus élevée pour les acides aminés ayant des chaînes latérales R plus polaires voire chargées et, *a contrario*, devrait interagir de façon répulsive vis-à-vis de ceux ayant une chaîne latérale R aliphatique (Figure 9).

A l'exception de certains échantillons, dont la méthode de préparation sera présentée en temps utile, les *wafers* de silicium cristallin ont tous été traités avant dépôt de la matière au

moyen des traitements expliqués ci-dessous. La mise en œuvre pratique du nettoyage est également expliquée pour chaque traitement.

#### D.1. Le traitement Piranha

##### D.1.1. Objectif recherché

Le traitement Piranha consiste à faire tremper les *wafers* dans une solution de nettoyage combinant les effets d'un oxydant fort ( $H_2O_2$ ) et d'un acide fort ( $H_2SO_4$ ) [28], en vue de s'affranchir de certaines impuretés (poussières, résidus lipidiques, ...). Cela est réalisé de façon à obtenir une surface ayant une composition chimique la plus uniforme possible et, de ce fait, d'éviter qu'il ne s'y trouve des zones où la matière que l'on souhaite déposer s'adsorberait préférentiellement ou, *a contrario*, des zones où l'adsorption de matière serait défavorisée.

En effet, les résidus hydrophobes tels que les graisses vont interagir préférentiellement avec les chaînes latérales des acides aminés qui sont plutôt hydrophobes (comme par exemple Ala, Leu ou encore Phe, qui ont des chaînes latérales aliphatiques) [29], ce qui peut mener à une répartition non-homogène des protéines lors du dépôt de la matière.

##### D.1.2. Mise en œuvre expérimentale

Les *wafers* sont trempés durant approximativement 15 minutes dans une solution Piranha, qui consiste en un mélange aqueux contenant  $H_2O_2$  (35% en masse) et  $H_2SO_4$  (95% en masse) dans un rapport volumique 1 : 2. Ils sont ensuite rincés individuellement durant une dizaine de secondes sous un filet d'eau ultra pure afin de retirer toute trace d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène.

Les *wafers* sont ensuite aspergés avec quelques gouttes d'isopropanol, ce qui a pour but de remplacer l'eau résiduelle par un liquide plus volatil dont l'élimination est ensuite facilitée par séchage à l'aide d'un flux d'azote.

#### D.2. Le traitement UV-ozone

##### D.2.1. Principe de fonctionnement de l'appareil et objectifs recherchés

L'ozone est formé par excitation de l'oxygène moléculaire (également appelé oxygène « triplet ») au moyen d'une lumière UV monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$  égale à 185 nm [30]. Cet oxygène « triplet » est ensuite photodissocié par excitation avec seconde lumière UV monochromatique ( $\lambda = 253,7$  nm) issue d'une lampe à vapeur de mercure, ce qui va des espèces radicalaires (appelées oxygène « singulet »). Ce sont ces espèces radicalaires qui vont réagir avec les contaminants organiques restés sur la surface du *wafer* de manière à les rendre volatiles à la pression et température atmosphérique.

Le traitement à l'ozone permet également l'uniformisation des *wafers* de silicium (fonctionnalisation par des groupements  $SiO_2$ ) sur toute sa surface au moyen d'une réaction oxydative radicalaire, ce qui accroît la mouillabilité du support et qui favorise donc les interactions hydrophiles avec les protéines qui y seront déposées.

### D.2.2. Mise en œuvre expérimentale

Les *wafers* ont été traité par UV-ozone durant 15 minutes à l'aide d'un un appareil *UVO-cleaner Model 42 Series* manufacturé par la firme *Jelight Company Inc.*

### D.3. Elaboration des échantillons de référence par adsorption forcée de matière au moyen de la technique du *spin-coating*

Dans le cadre de ce mémoire, des dépôts en couche mince de lysozyme (acheté auprès de la firme *Sigma-Aldrich* sous la forme d'une poudre lyophilisée) de différentes épaisseurs ont été obtenus par *spin-coating* de solutions protéiques de concentration croissantes<sup>5</sup> afin d'y mener différents types d'analyses (cf. *infra*). Le principe de cette méthode a été expliquée précédemment dans ce travail (voir section B.3). Après pesée d'une quantité adéquate, le lysozyme est dilué (à l'aide d'un vortex) dans de l'eau distillée.

Les dépôts sont enfin obtenus par *spin-coating* au moyen de l'appareil *Model WS-400B-6NPP/LITE* de la firme *Laurell Technologies Corporation*. Sauf exceptions qui seront mentionnées en temps utile, les paramètres utilisés pour l'élaboration des échantillons de références sont les suivants : une rotation de 4000 rpm durant 45 secondes.

### E. Techniques analytiques utilisées pour l'analyse de *wafers* et d'échantillons de référence

#### E.1. Mesure de l'angle de contact

L'appareillage utilisé pour les mesures d'angle de contact provient de la firme *Electronisch Ontwerp bureau de Boer* (Pays- Bas) dont une représentation schématisée été montrée à la figure 19.

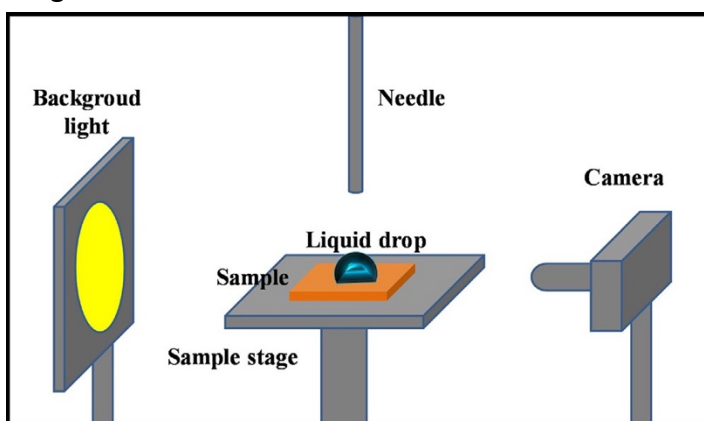


Figure 12 : Schéma de principe de l'appareillage utilisé pour les mesures d'angle de contact [31]

Cet appareillage est composé de différentes parties : une source de lumière, une micro-seringue permettant de déposer une goutte de liquide à la surface du *wafer* testé et une caméra, reliée à un ordinateur permettant de traiter l'image et de déterminer l'angle de contact de la goutte sur le support.

Pour effectuer la mesure, une goutte de 0,3  $\mu\text{l}$  est déposée sur la surface grâce à la micro-seringue, et la mesure de l'angle de contact affichée sur l'écran d'ordinateur est relevée 5 secondes après la mise en contact du liquide avec le solide, de manière à laisser la goutte prendre sa forme d'équilibre.

<sup>5</sup> Notons que la solubilité maximale de cette protéine dans l'eau à 25°C et à pH 7 est approximativement égale à 20 g/L.

## E.2. Mesure de l'épaisseur de couches minces par ellipsométrie

### E.2.1. Principe théorique de la mesure

L'ellipsomètre est un instrument permettant de mesurer l'épaisseur (moyenne) d'une couche mince de matériel transparent déposé sur une surface plane. La technique se base sur la variation des composantes vectorielles d'un faisceau de lumière polarisée, située dans le spectre proche-infrarouge, lorsque celui-ci est réfléchi sur une surface (une lumière polarisée est une lumière dont la composante magnétique a été filtrée grâce à un dispositif appelé « polariseur »). Lorsque cette lumière polarisée arrive sur une surface, celle-ci aura plusieurs destinées (figure 20):

- Réflexion
- Passage au travers de la matière et réfraction
- Absorption au sein de la matière
- Transmission

En ellipsométrie, ce sont les deux premières contributions qui sont exploitées [32]. Il en existe cependant une variante qui utilise la partie transmise de la lumière à travers une surface [33].

La composante électrique d'une onde lumineuse (qui est alors une onde plane) peut être caractérisée par deux contributions, l'une étant perpendiculaire au plan d'incidence de l'onde plane et l'autre lui étant parallèle (elles seront respectivement symbolisées par  $E_s$  et  $E_p$  dans la suite de cette section). Ces contributions vectorielles de  $E$  peuvent être écrites en termes mathématiques par une fonction dont le temps  $t$  est l'unique variable [34]:

$$E_s = r_s * \cos\left(\omega\left(t - \frac{z}{v}\right) + \Delta_s\right)$$

$$E_p = r_p * \cos\left(\omega\left(t - \frac{z}{v}\right) + \Delta_p\right)$$

Avec :

- $\omega$  la vitesse angulaire de l'onde
- $t$  le temps
- $z$  la position du vecteur sur l'axe  $z$  de propagation de l'onde
- $v$  la vitesse linéaire de propagation de l'onde
- $r$  l'amplitude maximale de chacune des ondes
- $\Delta$  la différence de phase de chacune des ondes

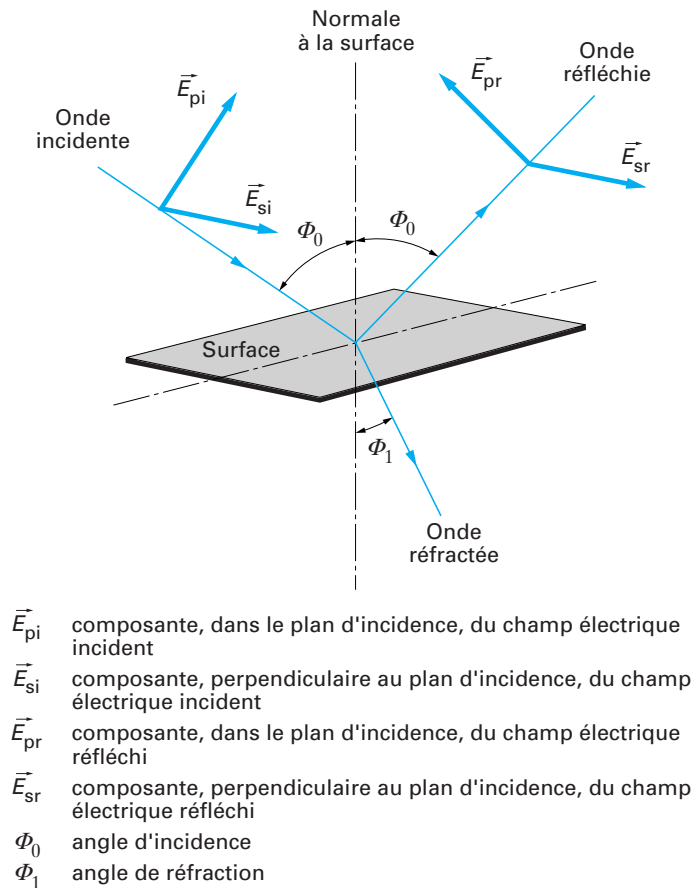


Figure 20 : Réflexion d'une onde polarisée plane sur une surface réfléchissante [32]

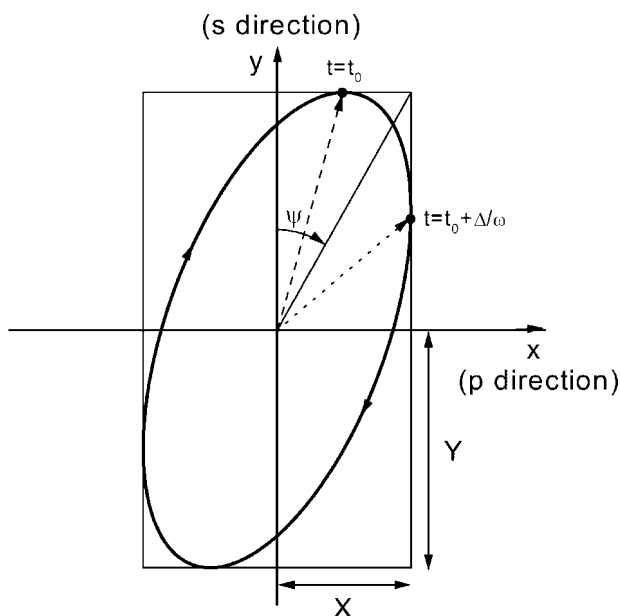


Figure 21 : Représentation schématique de l'ellipse de la lumière elliptiquement polarisée [35]

Pour une lumière polarisée de manière « elliptique », les grandeurs  $r_s$  et  $r_p$  sont différentes, d'où la trajectoire elliptique (Figure 21) du vecteur électrique (qui est la résultante des vecteurs  $E_s$  et  $E_p$ ).

Lors de la réflexion sur la surface, les vecteurs  $E_s$  et  $E_p$  vont voir leur orientation et leur amplitude modifiées. On dénote par  $|r_p|$  et  $|r_s|$  la modification de l'amplitude des composantes parallèles et perpendiculaires de l'onde lors de la réflexion sur la surface. Le rapport de ces modules est défini comme suit :

$$\tan \psi = \frac{|r_p|}{|r_s|} \quad (\text{éq. 2})$$

Ce rapport se base sur l'hypothèse que la couche analysée ne possède pas de couche d'oxyde ni de rugosité de surface.

Le changement de l'orientation des composantes  $E_s$  et  $E_p$  est appelé *différence de phase* et est symbolisé par la lettre grecque  $\Delta$ . Une différence de phase survient lorsque l'onde passe au

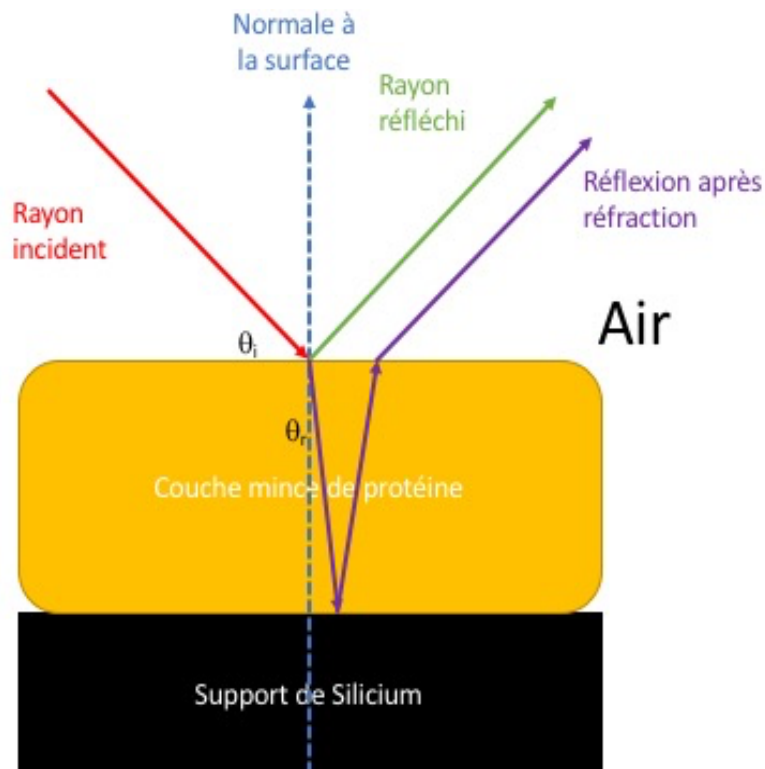


Figure 22 : Réfraction d'une onde lors de la pénétration d'une onde dans des milieux possédant des indices de réfractifs différents

travers de milieux possédant des indices de réfraction (symbolisés par la lettre  $n$ ) différents (Figure 22). L'indice de réfraction d'un milieu donné est égal au rapport des vitesses de propagation de la lumière dans le milieu considéré et celle dans le vide ( $3.10^8$  m/s).

L'ellipsomètre effectue des mesures successives de  $\Delta$  et de  $\tan(\psi)$  pour plusieurs angles d'incidences du faisceau de lumière polarisée (MAIE – *Multiple Angles of Incidence Ellipsometry*) qui sont ensuite analysées par un modèle mathématique informatisé, utilisant pour paramètre l'indice de

réfraction de la couche d'oxyde de silicium sur lequel est déposé l'échantillon.

Si on définit  $\beta = 2 \cos \Delta \frac{\tan^2 \psi + \tan^2 A}{\tan \psi + \tan A}$  avec  $A$  l'angle de l'analyseur, l'épaisseur de couche  $d$  se déduit via la relation :  $d = \frac{\lambda \beta}{2\pi \cos \phi}$ ,  $\lambda$  étant la longueur d'onde du laser incident et  $\phi$  l'angle de réfraction du laser au sein de la couche transparente.

L'ellipsométrie est une technique analytique rapide et facile à mettre en œuvre. Elle donne une valeur moyennée de l'épaisseur d'une couche transparente, mais ne permet pas d'obtenir des indications sur la topographie de la couche, sur la présence de pores au sein de celle-ci ou encore sur le taux de recouvrement de la surface. Pour obtenir ces informations, il est préférable d'utiliser d'autres méthodes telles que l'AFM (Microscopie à Force Atomique), le SIMS depth-profiling ou la profilométrie.

### E.2.2. Appareillage et mise en œuvre

Pour les mesures effectuées dans le cadre de ce travail, c'est un ellipsomètre à polariseur tournant, basé sur la méthode MAIE, qui a été utilisé (Figure 23).

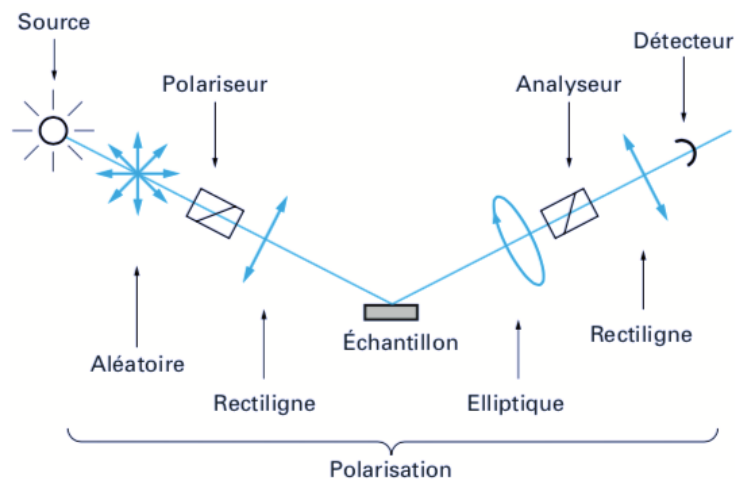


Figure 23 : Représentation schématique de l'ellipsomètre à polariseur tournant [32]

L'appareillage est composé :

- d'une source lumineuse émettant une lumière monochromatique dans le proche infrarouge (grâce à une lampe au xénon) ;
- d'un polariseur permettant de filtrer la composante magnétique de la lumière, de manière à ne transmettre que sa composante électrique ;
- d'un compensateur (elliptique), placé à la suite du polarisateur dans le cas de l'appareil utilisé, dont le rôle est de transformer l'onde plane en sortie du polariseur en une onde elliptique (la figure 23 représente un cas dans lequel la compensation est réalisée après réflexion, alors que dans le cas de l'appareil *EP4 Model (Accurion)*, l'onde frappant l'échantillon a déjà une forme elliptique).
- d'un support pour placer l'échantillon à analyser ;
- d'un bras tournant se déplaçant de manière à capter le rayon lumineux réfléchi (ce qui détermine son angle de réflexion) et qui, une fois qu'il est aligné avec celui-ci, mesure l'amplitude de sa composante électrique.
- d'un analyseur (photomultiplicateur) (servant de détecteur), qui transforme l'intensité du rayon capté en un signal électrique qui est ensuite traité par un système électronique informatisé.

Les mesures par ellipsométrie ont été réalisées à l'aide d'un appareil *EP4 Model* manufacturé par la société *Accurion*. Une photographie légendée de l'appareillage est montrée à la figure 24 ci-dessous.

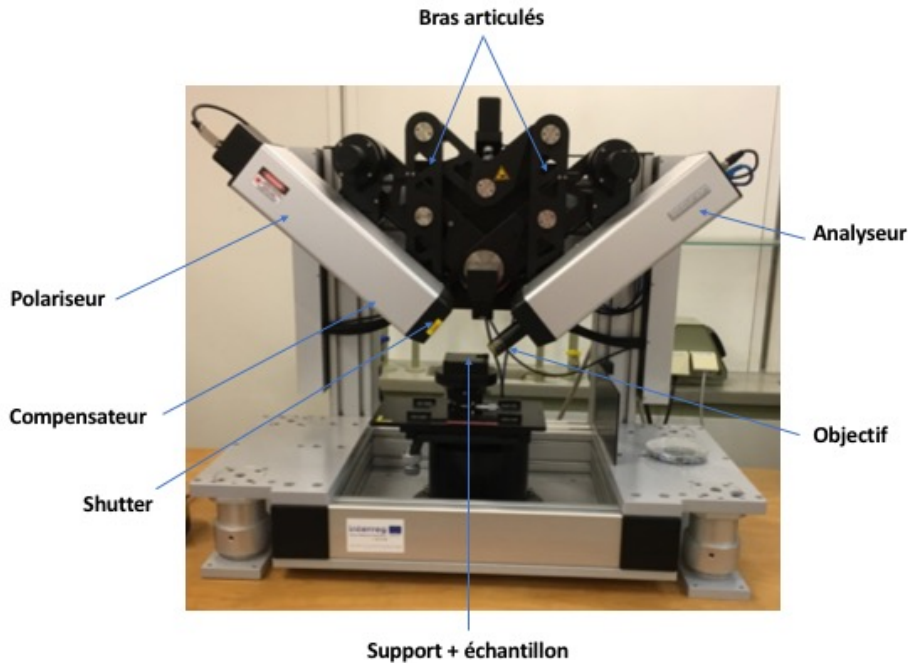


Figure 24 : Photographie légendée de l'ellipsomètre Accurion EP4 Model utilisé dans le cadre de ce mémoire

Le bras de gauche contient le polariseur de lumière et le compensateur ; le bras de droite contient un objectif caméra à grossissement variable et un analyseur.

La procédure utilisée lors des mesures est détaillée ci-dessous :

- Les bras articulés (qui sont couplés entre eux de manière à garder de manière permanente un AOI<sup>6</sup> similaire) sont initialement orientés de façon à former chacun un AOI de 50° par rapport au vecteur normal à la surface analysée ;
- Ouverture du shutter, situé à l'extrémité basse du polariseur, ce qui permet à la lumière polarisée de pouvoir sortir du bras articulé. Le laser est constitué d'une lumière monochromatique de longueur d'onde égale à 658 nm. ;
- L'échantillon est placé de sorte à ce qu'il soit illuminé par le faisceau de lumière polarisée ;
- Etalonnage de la lentille qui permet la focalisation de la lumière réfléchie vers l'analyseur ;
- Réglage de la hauteur (axe Z) du porte-échantillon de manière à maximiser le ROI<sup>7</sup> signal ;
- Alignement du laser selon les axes X et Y (axes horizontaux) de manière à centrer le laser sur l'échantillon.

<sup>6</sup> AOI = Angle Of Incidence

<sup>7</sup> ROI = Region of Interest

- Ajustement de l'angle initial de polarisation de manière à minimiser le signal (par dichotomie). Une étape similaire est réalisée avec l'analyseur. Le signal est en effet minimisé lorsque l'orientation du vecteur E est soit parallèle, soit perpendiculaire par rapport au plan d'incidence du faisceau laser. Dans ce cas-là, le champ électrique va garder son orientation initiale après réflexion sur l'échantillon. Il faut ensuite régler l'orientation du bras de l'analyseur de façon à ce que le faisceau réfléchi soit dans l'axe la lentille de focalisation ;
- Ajustement des paramètres de mesure : *two zones, 4 iterations, P\_range = 3° et A\_Range = 3°*. Les deux dernières valeurs définissent la variation d'AOI du polariseur et de l'analyseur entre chaque itération. Dans notre cas, nous avons effectué 4 itérations par AOI, qui a été paramétré de manière à évoluer de 50° à 80° par pas de 3°. Le nombre de points mesurés est donc égal à 44.

Les résultats (qui sont regroupés au sein d'une matrice de données contenant les mesures de  $\psi$  et de  $\Delta$  pour chaque itération) ont été stockés dans le logiciel *Accurion Data Studio* et puis ont été traités avec le logiciel *Accurion EP4Model*, qui a utilisé un modèle mathématique utilisant un angle de réfraction  $N = n + ik$  ayant comme paramètres  $n = 1,456$  et  $k=0$  ( $n, k$  fix) (données issues à partir du site internet [36]). Il s'agit d'un modèle adapté pour des supports en silicium d'une épaisseur de couche d'oxyde variant entre 163 et 2480 nm.

Le modèle mathématique affiche une valeur brute d'épaisseur de couche ainsi qu'une marge d'erreur sur la mesure qui est inhérent à cette détermination.

### E.3. Caractérisation de surface par ToF-SIMS

#### E.3.1. Principe théorique de la mesure

La technique ToF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) est une technique semi-quantitative d'analyse de surface qui consiste à réaliser une analyse par spectrométrie de masse des ions (dits « secondaires ») émis lorsque la surface à analyser est bombardée par un faisceau d'ions primaires (Figure 17). Cet aspect a déjà été discuté à la section C de la partie introductive.

Parmi les particules secondaires émises de la matière analysée, une partie de celles-ci sont des fragments ionisés. Il s'agit des particules qui peuvent être séparées par l'analyseur de masse à temps de vol (Figure 25). Chaque particule chargée peut être caractérisée par son rapport  $m/z$ ,  $m$  étant la masse de la particule (en Daltons) et  $z$  la charge de la particule. En mode *positif* (qui sera exclusivement utilisé pour nos analyses dans le cadre de ce mémoire), ce seront les cations ( $z = +1$ ) qui seront analysés et traités.

Au sein de l'analyseur à temps de vol, les ions sont initialement accélérés par une différence de potentiel, leur procurant une énergie cinétique identique quel que soit leur nature [37]. En effet, comme le montre l'équation 3 ci-dessous, l'énergie cinétique engendrée au sein de l'accélérateur de particules n'a pour variable que la charge de la particule, et est donc indépendante de la masse de celle-ci :

$$E_{cin} = \frac{1}{2}mv^2 = z \Delta V \quad (\text{éq. 3})$$

avec  $v$  la vitesse des particules

$\Delta V$  la différence de potentiel permettant d'accélérer la particule.

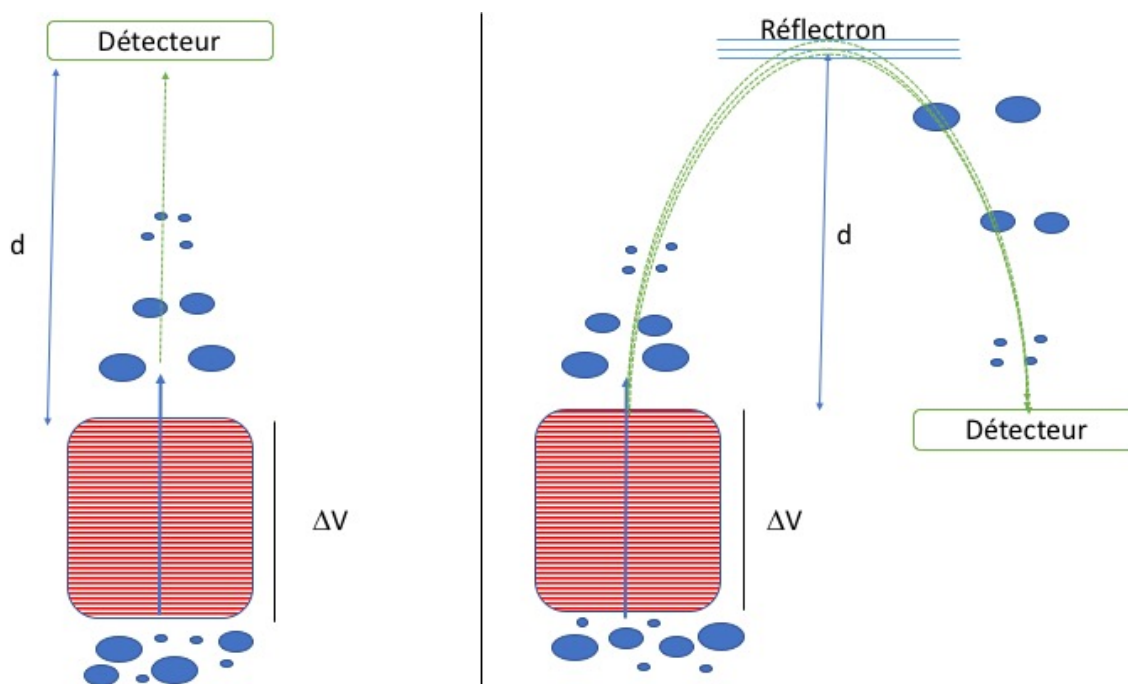


Figure 25 : Schéma de principe de l'analyseur à temps de vol, sans réflectron (gauche) et avec réflectron (droite)

A la sortie de l'accélérateur, les particules possèdent toutes une énergie cinétique identique, mais ont toutefois une masse  $m$  intrinsèque qui dicte la vitesse à laquelle les particules se meuvent (membre central de l'équation 3). Au sein de l'analyseur TOF, dans lequel un vide poussé règne de manière à éviter les collisions avec des molécules en phase gazeuse et les décharges d'ions qui en découleraient, les ions parcourent une distance fixe entre l'accélérateur de particules et le détecteur. La mesure du temps de vol permet donc de déterminer le rapport  $m/z$  de la particule (voir les équations 4 et 5 en considérant une distance égale à  $d$  dans le cas d'un analyseur linéaire (sans réflectron)).

Cependant, il existe une certaine dispersion dans l'accélération des ions ayant pourtant un rapport  $m/z$  similaire. Cela est attribuable à deux phénomènes distincts. Premièrement, de la topographie inhomogène de la surface analysée découle des angles de collisions qui seront différents selon l'endroit frappé par le faisceau primaire, ce qui engendrera des différences d'énergie cinétique entre les particules émises. Deuxièmement, les collisions entre la particule primaire et la matière bombardée ne sont pas entièrement élastiques, et une partie variable de l'énergie cinétique des *clusters* primaires peut être absorbée. Les ions ayant pourtant un même rapport  $m/z$  peuvent donc posséder des énergies cinétiques distinctes, et arriver de manière asynchrone au niveau du détecteur avec pour conséquence une baisse de la résolution du spectre.

Le réflectron est un dispositif qui permet de corriger ces erreurs de dispersion [38]. Il se base sur l'effet d'un champ électrique sur une particule chargée en mouvement (force de Lorentz)

qui permet à la particule de rebrousser chemin une fois arrivée à l'intérieur du réflectron. Plus la vitesse de la particule sera élevée, plus celle-ci va entrer profondément au sein du réflectron et donc parcourir une distance plus importante. La finalité de ce dispositif est de permettre de corriger les erreurs dans la dispersion des énergies cinétiques entre des particules identiques, de façon à ce que les ions ayant le même rapport  $m/z$  arrivent en même temps au niveau du détecteur, ce qui accroît grandement la résolution des spectres que l'on obtient.

Pour l'analyseur à temps de vol possédant un réflectron, le temps  $t$  qui est nécessaire pour parcourir deux fois la distance  $d$  (soit un aller-retour sur le schéma ci-contre) est uniquement dépendant de la vitesse  $v$  de l'ion à la sortie de l'accélérateur :

$$t = \frac{2d}{v} \quad (\text{éq. 4})$$

En isolant  $v$  de l'équation 4 ci-dessus et en l'injectant dans l'équation 3, nous obtenons l'équation 5 qui relie le rapport  $m/z$  au temps de vol des ions (qui est la seule variable de cette relation) :

$$\frac{m}{z} = \frac{\Delta V t^2}{2d^2} \quad (\text{éq. 5})$$

Les ions ayant des rapports  $m/z$  différents arriveront donc à un moment différent au niveau du détecteur (une électrode), qui transforme chaque collision en un signal électrique. A chaque fois qu'un ion positif frappe l'électrode, un électron en est retiré de manière à neutraliser celui-ci. Le détecteur va donc mesurer le nombre d'électrons ayant servi à compenser la charge des ions positifs, et le relier au nombre de coups total à cet instant  $t$ .

### E.3.2. Appareillage

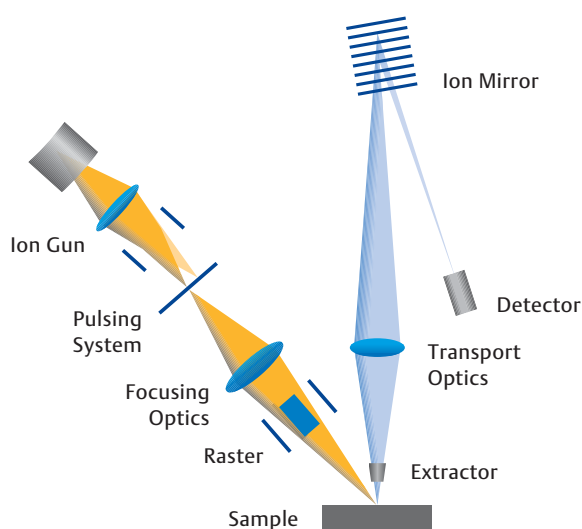


Figure 26 : Schéma de l'appareillage TOF.SIMS<sup>5</sup> (ION TOF)

Les mesures de spectrométrie de masse des ions secondaires ont été réalisées à l'aide de l'appareil TOF.SIMS<sup>5</sup> de la firme ION TOF.

La figure 26, reprise de la brochure technique de l'appareil [39], montre les différents éléments le composant : une source d'ions (dans notre cas, il s'agira de sources de cluster de bismuth ou d'argon qui sont créés à l'aide d'une source de type LMIG<sup>8</sup> ou GCIB<sup>9</sup> et d'un système générant des impulsions électriques permettant l'émission des ions primaires ; une lentille permettant de focaliser le

<sup>8</sup> LMIG = Liquid Metal Ion Gun, qui est utilisé dans ce mémoire pour émettre des clusters d'analyse Bi<sub>5</sub><sup>+</sup> ou le faisceau de transfert Bi<sub>x</sub><sup>+</sup> (voir *infra*)

<sup>9</sup> GCIB = Gas Cluster Ion Beam, qui est utilisé pour générer les agrégats d'argon Ar<sub>330</sub><sup>+</sup> et Ar<sub>3000</sub><sup>+</sup>

faisceau ; un raster permettant de positionner la zone d'analyse ; l'échantillon à analyser, monté sur un porte-échantillon de type *backmount* ; un analyseur ToF.

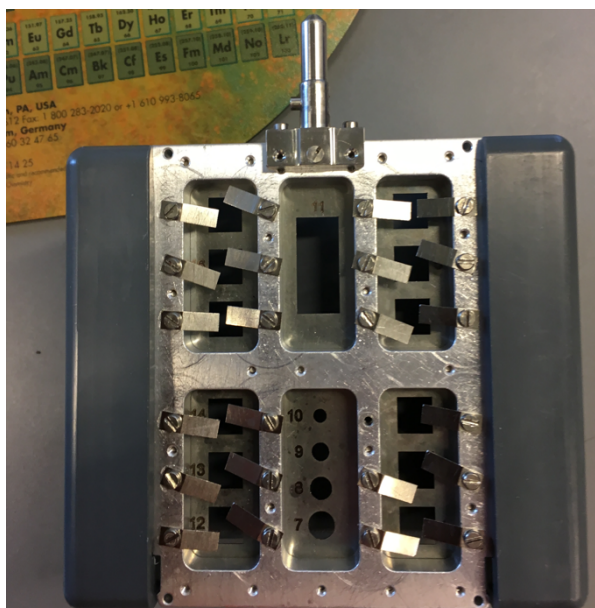


Figure 27 : Porte-échantillon de type "backmount"

Le porte-échantillon de type *backmount* (figure 27) est un dispositif en acier comprenant une série de cavités dont les fonds sont percés à l'aide d'une ouverture. Pour chacune de ces cavités, un échantillon différent peut-être placé de sorte que la face à analyser puisse être visible au travers de ces fenêtres. Les échantillons sont bloqués dans leurs cavités à l'aide de cales en acier et de systèmes de double-plaques en acier fixés chacun à l'aide de vis. Les éventuelles poussières à la surface des échantillons sont retirées à l'aide d'un flux d'air avant que le porte-échantillon soit placé dans l'appareil.

Comme évoqué précédemment, l'ensemble est confiné de manière hermétique de manière à travailler dans des conditions de vide poussé (de l'ordre de  $2.10^{-9}$  bar dans notre cas).

### E.3.3. Analyse spectrale ponctuelle

Dans le cas d'une analyse spectrale ponctuelle, l'acquisition des données est réalisée sur une petite portion de l'échantillon (que l'on appelle *raster*). En mode statique, cette région est balayée par le faisceau de *clusters* primaire, et les particules secondaires émises sont directement traitées par l'analyseur à temps de vol.

Le faisceau primaire est caractérisé par sa *densité de dose*, qui correspond au nombre de charges provenant des *clusters* bombardés sur une surface de  $1 \text{ cm}^2$  durant toute l'analyse (son unité est exprimée en  $\text{C/mm}^2$ ). Au sein d'un *raster*, le faisceau primaire va bombarder des portions aléatoires, correspondant à ce qu'on appellera ultérieurement des *pixels*, durant une période très courte, qui est quant à elle appelée *cycle time*. En mode d'analyse random, qui a été utilisée pour la caractérisation de nos échantillons, l'ordre des *pixels* qui sont bombardés au sein d'un même *raster* durant une analyse spectrale est aléatoire.

L'analyse des ions secondaires fournit un ensemble de résultats (appelé « spectre ») montrant l'abondance de chaque ion émis. A chaque pic va correspondre un ion de nature précise - pour autant que la résolution du spectre soit suffisante - et à chaque ion va pouvoir être associée une information (semi-)quantitative. Dans notre cas, il s'agira des ions issus de la fragmentation des différents acides aminés ainsi que ceux issus du *wafer* de silicium (se référer au tableau VI de l'Annexe I pour de plus amples informations).

## Mise en œuvre

Les échantillons de couches minces de protéines obtenues par *spin-coating* ont été montés sur un porte-échantillon de type *backmount* afin d'être analysés en SIMS, en utilisant les différents faisceaux d'analyse dont la nature et les paramètres associés sont présentés dans le Tableau II ci-dessous.

Tableau II: Présentation des différents types de faisceau pour l'analyse des échantillons spin-coatés et paramètres d'analyse

| Type de faisceau (et source d'ion)                             | Energie des agrégats      | Cycle time | Taille du raster | Temps d'analyse |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------|------------|------------------|-----------------|
| Bi <sub>5</sub> <sup>+</sup> (LMIG en mode HCB <sup>10</sup> ) | 30 keV<br>(6 keV/atome)   | 100 μs     | 500 x 500 μm     | 60 s            |
| Ar <sub>3000</sub> <sup>+</sup> (GCIB – 30 bars)               | 10 keV<br>(3,3 eV/atome)  | 400 μs     | 500 x 500 μm     | 120 s           |
| Ar <sub>330</sub> <sup>+</sup> (GCIB - 15 bars)                | 20 keV<br>(60,6 eV/atome) | 100 μs     | 500 x 500 μm     | 300 s           |

Pour les échantillons spin-coatés, les mesures ont été effectuées sur des *rasters* présentant une certaine homogénéité de surface, que l'on peut vérifier grâce à la caméra permettant de positionner le *raster* d'analyse. Chaque échantillon a été analysé en mode positif sur 3 *rasters* différents (des mesures supplémentaires ont été réalisées le cas échéant dans le cas où les résultats obtenus avec les 3 premières mesures montraient des divergences entre-elles trop importantes). Une mesure par échantillon a également été effectuée en mode négatif, mais ces données n'ont pas été exploitées dans le cadre de ce mémoire. En effet, les ions chargés négativement et attribuables à la fragmentation des acides aminés sont très peu nombreux.

Pour effectuer ces mesures, les conditions d'analyse ne nous ont pas permis d'observer les pics associés à des ions dont la masse excède 200 u.m.a, et en particulier l'ion moléculaire du lysozyme, dont la masse est de 14,3 kDa. Nous focaliserons donc nos résultats uniquement sur base des pics situés dans l'intervalle [0-200] Daltons.

### E.3.4. Acquisition des données par imagerie SIMS (SIMS *imaging* ou SIMS *scanning*)

L'imagerie SIMS consiste à scanner l'ensemble de la surface d'un échantillon par obtention d'analyses ponctuelles successives sur des portions adjacentes de surface, de manière à obtenir une image composée d'un ensemble de spectres propres à chacun des pixels qui la compose [40]. Le *raster* est d'abord positionné sur le coin supérieur gauche de l'échantillon que l'on souhaite scanner (par rapport à l'image que l'on observe sur l'écran de contrôle) et le faisceau d'analyse réalise des mesures de manière aléatoire sur l'entièreté du *raster*, lequel est typiquement divisé en 256 x 256 pixels. Toutes les 100 μs (c'est-à-dire la valeur paramétrée du *cycle time* utilisée), le faisceau d'analyse va extraire les ions secondaires sur un pixel choisi aléatoirement au sein du *raster* et y associer un spectre montrant la composition de la couche de matière au niveau de celui-ci. Lorsque le nombre de pixels analysés est égal à (256 x 256 x le nombre de frames) que l'on a défini dans les paramètres de l'analyse, l'acquisition des

<sup>10</sup> HCB = High Current Bunched

données est interrompue, et le porte-échantillon se déplace vis-à-vis de l'*ion gun* de manière à se positionner sur un *raster* adjacent, et l'opération est reproduite.

En se déplaçant ainsi de *raster* en *raster*, l'analyse va être effectuée sur l'entièreté de l'échantillon. Le nombre de scans représente le nombre de fois que les mesures vont être effectuées sur l'ensemble du support.

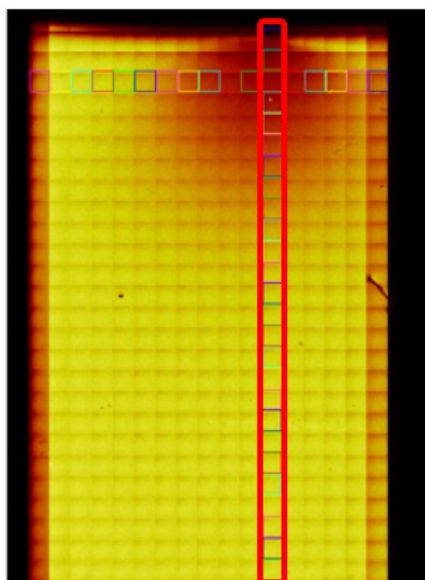


Figure 29 : Extraction des spectres issus d'une imagerie SIMS par la construction de Rasters On Image (ROI's)

Dans le cadre de ce mémoire, nous n'allons nous intéresser qu'à la portion du collecteur qui est située directement dans l'axe du faisceau ayant permis d'effectuer le transfert. Pour parvenir à cette fin, des ROI's (*Regions Of Interest*) d'une taille de  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$  ont été sélectionnés manuellement sur les imageries SIMS obtenues (il s'agit des *rasters* contenus dans le cadre dessiné sur l'image de la figure 29 ci-contre), et les spectres que nous allons traiter ont été directement extraits de ces régions d'intérêts.

Chaque collecteur a été scanné à l'aide des 3 faisceaux d'analyse susmentionnés (Tableau II), ce qui représente donc un total de 9 imageries SIMS. L'analyse a couvert l'ensemble de la surface du collecteur, soit une surface de  $10 \times 13 \text{ mm}^2$ . Cependant, comme nous le verrons plus tard, seuls les résultats obtenus avec le faisceau de bismuth ont été interprétés (voir section I.2). Les paramètres utilisés pour l'analyse des collecteurs sont présentés dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III : Paramètres utilisés lors de l'analyse des collecteurs après transfert pour chaque faisceau d'analyse

| Faisceau d'analyse   | Énergie des agrégats (keV) | Nombre de frames | Taille de la zone analysée (mm x mm) | Nombre de scans | Cycle time ( $\mu\text{s}$ ) |
|----------------------|----------------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------------|
| $\text{Bi}_5^+$      | 30                         | 4                | 10 x 13                              | 1               | 100                          |
| $\text{Ar}_{330}^+$  | 20                         | 10               | 10 x 13                              | 1               | 100                          |
| $\text{Ar}_{3000}^+$ | 10                         | 6                | 10 x 13                              | 1               | 100                          |

### Acquisition des données spectrales

L'extraction des spectres et l'exploitation des données obtenues ont été réalisées à l'aide du logiciel *Measurement Explorer*, développé par le fabricant de l'appareil (*ION TOF*). Avant extraction des données, ce logiciel nécessite une calibration de masse sur les spectres afin d'éviter les déviations de masse qui fausseraient les résultats, qui sont exprimés en termes d'aire sous la courbe du spectre entre les bornes délimitant chaque signal en termes de rapports  $m/z$ .

Pour le faisceau de bismuth, les pics utilisés pour la calibration sont les suivants :  $\text{CH}_3^+$  ( $m/z = 15$ ),  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  ( $m/z = 29$ ),  $\text{C}_3\text{H}_5^+$  ( $m/z = 41$ ) et  $\text{C}_4\text{H}_7^+$  ( $m/z = 55$ ). Pour les faisceaux d'argon, la

calibration a été effectuée sur les pics suivants :  $\text{NH}_4^+$  ( $m/z = 18$ ),  $\text{CH}_4\text{N}^+$  ( $m/z = 30$ ) et  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$  ( $m/z = 70$ ).

#### E.3.5. Principes et application de l'analyse multivariée (PCA)

L'analyse par SIMS d'échantillons va générer une quantité très importante de données qu'il faut pouvoir traiter en vue d'obtenir les informations les plus représentatives de la variabilité entre les différents spectres obtenus. La PCA (*Principal Components Analysis*) est une méthode d'analyse multivariée qui consiste à établir des corrélations entre plusieurs variables de manière à pouvoir assimiler chaque « groupement » de  $x$  variables à une nouvelle variable unique (qui est une combinaison linéaire des  $x$  variables associées). [40]

En termes plus mathématiques, les données récoltées lors de l'analyse des échantillons de référence peuvent être regroupées en une matrice à  $C \times n \times p$  dimensions,  $C$  étant la concentration de la solution protéique ayant servi à fabriquer la couche mince,  $n$  étant le nombre de *rasters* analysés sur un même échantillon (ou le nombre de *rasters* analysés sur un ensemble d'échantillons préparés de manière identique), et  $p$  étant un vecteur contenant les intensités de l'ensemble des pics qui ont été sélectionnés. Dans le cas des imageries SIMS réalisées sur les collecteurs, la matrice aura une dimension  $n \times m \times p$ , ( $n \times m$  représentant le nombre de pixels composant l'image et  $p$  le vecteur contenant les intensités de chacun des pics sélectionnés pour chaque pixel).

A partir de cette matrice, la PCA va approximer une nouvelle matrice de données à  $q$  variables contenant la plupart des informations contenues dans la matrice de données originelle. D'un point de vue pratique, la PCA est opérée selon le protocole expliqué ci-dessous.

Soit  $X$  la matrice à analyser :

- Normalisation des données : Plusieurs stratégies sont envisageables (par rapport au signal total du spectre, par rapport au signal du pic le plus intense, etc.) mais celle choisie dans notre cas est une division de l'intensité des spectres obtenus par la somme des pics issus de la fragmentation des acides aminés. Cette normalisation a été choisie de manière à s'affranchir de la présence d'éventuels contaminants, mais aussi de pouvoir obtenir des informations concernant la conformation des protéines ou d'éventuels phénomènes d'interaction entre celles-ci. On obtient donc une matrice  $X_{\text{norm}}$  contenant l'ensemble des données normalisées.
- Centrage des données (*mean center method*) : on retire à chaque valeur de  $X_{\text{norm}}$  ( $x_{\text{norm}}$ ) la valeur moyenne  $x_{\text{norm}}^{\text{moy}}$  de façon à obtenir une distribution centrée autour de 0 :  

$$x_{\text{norm}}^C = x_{\text{norm}} - x_{\text{norm}}^{\text{moy}} ;$$
- Standardisation des données :  $x_{\text{norm}}^S = x_{\text{norm}}^C / s$ ,  $s$  étant la déviation standard sur la série de données  $x_{\text{norm}}$ . On crée une nouvelle matrice  $X_{\text{norm}}$  contenant l'ensemble des valeurs centrées et standardisées.
- Calcul de la matrice  $X_{\text{norm}}^T * X_{\text{norm}}$ ,  $X_{\text{norm}}^T$  étant la matrice transposée de  $X_{\text{norm}}$  ;

- Calcul d'un vecteur propre de la matrice  $X_{norm}^T * X_{norm}$ , c'est-à-dire un vecteur  $p$  tel qu'il existe une valeur (« propre »)  $\lambda_p$  tel que :  $X_{norm}^T * X_{norm} * p_j = \lambda_p * p_j$  ;
- Chaque vecteur propre  $p_j$  définit une nouvelle variable  $t_j = \sum_{i=1}^k p_{jk} * X_k$  appelée *composante principale* ou *loading* et étant une combinaison linéaire des vecteurs  $X_{norm}^T * X_{norm} * p_j$  ;
- Pour chaque *loading*, on peut enfin calculer un vecteur de projection (*score*) des données de la matrice  $X_{norm}$  sur ces nouvelles composantes  $t_j$

Les scores obtenus qui seront les plus proches de la valeur 1 désigneront les composantes principales (c'est-à-dire, celles qui expliqueront la plus grande partie de la variabilité entre les différents spectres). Un graphe des *loadings* permettra, quant à lui de trouver des liens de corrélation entre diverses composantes principales.

L'analyse multivariée des spectres a été réalisée par le programme *SpectraGui* du logiciel *NESAC/BIO Toolbox* qui a été fourni par Dan Graham (Université de Washington, USA). Ce programme utilise l'environnement MATLAB 2011b, développé par *MathWorks*.

## F. Transfert moléculaire au moyen de faisceaux de clusters ionisés

### F.1. Préparation des cibles et des collecteurs

Une cible sert, pour rappel, de support à la matière que l'on souhaite transférer. Il s'agit d'un *wafer* de silicium sur lequel est déposée une couche très épaisse de lysozyme. Elle est préparée selon le protocole suivant : une goutte de 50  $\mu$ l d'une solution protéique saturée (20 mg/ml) est déposée sur un *wafer* de dimension 0,3 x 1 cm (nettoyé au moyen d'une solution Piranha et d'un traitement UV-ozone), puis est séchée à l'air ambiant. L'objectif est ici d'obtenir une couche de matière la plus épaisse possible pour optimiser le transfert moléculaire.

La matière transférée depuis la cible va être déposée sur un collecteur. Ce collecteur un *wafer* de silicium d'une taille approximative de 1,4 x 1,4 cm, ayant été nettoyé selon le protocole décrit auparavant (section D.1 et D.2).

### F.2. Mise en œuvre du transfert moléculaire

Le transfert moléculaire a été réalisé à l'aide du porte-échantillon *topmount*, schématisé à la Figure 29 ci-dessous. Il s'agit d'un porte-échantillon en acier, sur lequel le collecteur et la cible ont été collés à l'aide d'un auto-collant double-face. Le collecteur est disposé horizontalement sur le porte-échantillon tandis que la cible est située sur un plan incliné, comme montré auparavant à la figure 18.

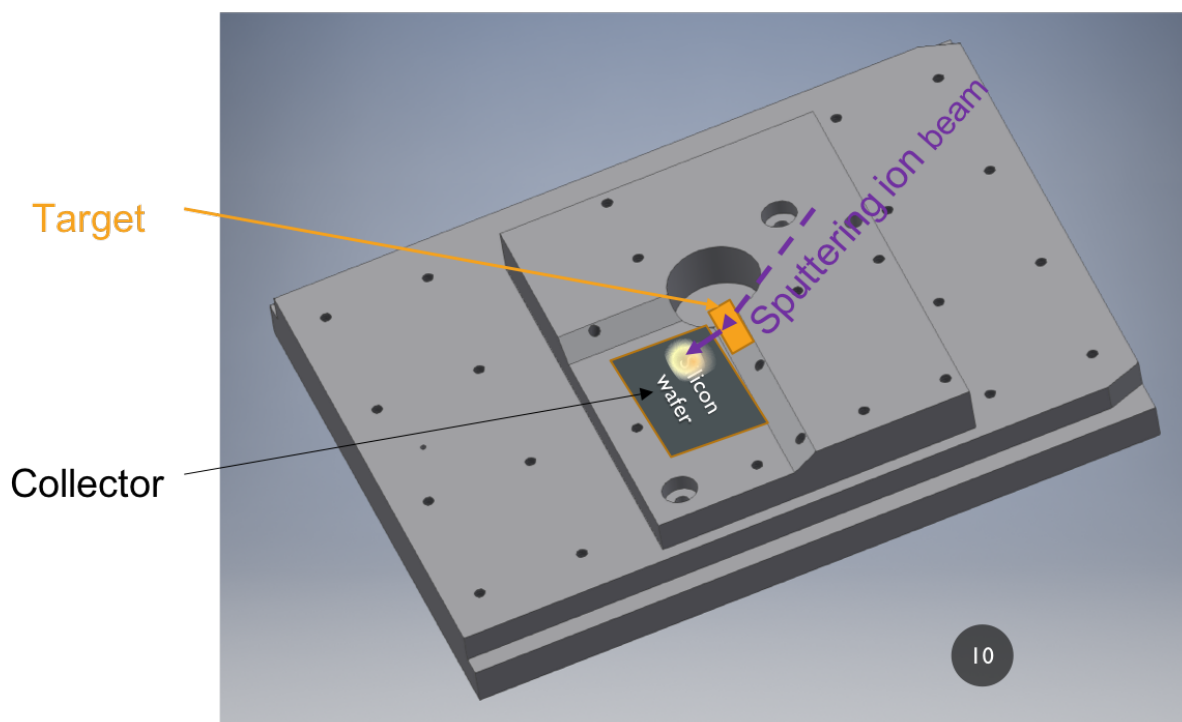


Figure 29 : Schéma illustrant le montage utilisé pour le transfert de lysozyme à l'aide du porte-échantillon "topmount"

Le faisceau d'ions primaires, servant à transférer les biomolécules depuis la cible vers le collecteur, forme un angle de 45° avec l'horizontale. Plusieurs faisceaux de *clusters* ionisés, se distinguant par des propriétés énergétiques (tableau IV, page suivante) ont été testés pour effectuer le transfert de lysozyme.

Le premier transfert qui a été effectué durant ce mémoire fût celui réalisé avec  $\text{Ar}_{3000}^+$  (10 keV) en tant que faisceau primaire. Le transfert s'est réalisé pendant une durée totale de 16h.

Le second transfert a été réalisé à l'aide d'un faisceau d'agrégats de bismuth, qui, pour des raisons techniques, n'était pas composé uniquement d'ions  $\text{Bi}_5^+$ , mais d'un mélange de  $\text{Bi}_1^+$  (environ 70% en nombre), de  $\text{Bi}_3^+$  et de  $\text{Bi}_5^+$ . Un faisceau d'ions homogène de  $\text{Bi}_5^+$  est techniquement possible à obtenir (il s'agit de l'un des faisceaux d'analyse que nous avons utilisés), mais nous aurions obtenu une intensité très faible (et par voie de conséquence, une densité de dose très faible) pour ce faisceau d'ions primaires, ce qui aurait augmenté considérablement le temps nécessaire au transfert de protéines.

Le troisième transfert a été réalisé à l'aide d'un faisceau d'agrégats  $\text{Ar}_{330}^+$  (20 keV). Dans le tableau III, nous observons que la densité de dose qui a été bombardée sur la cible est bien inférieure à celle utilisée pour le transfert avec les deux autres types de faisceau. Une nouvelle fois, cela est dû à la faible valeur d'intensité que l'on a pu obtenir pour ce faisceau (il n'était techniquement pas possible d'en obtenir une plus intense plus élevée). Si nous avions voulu que les valeurs soient similaires, il aurait fallu augmenter le temps de transfert jusqu'à environ 48 heures, ce qui n'a pas été fait pour des raisons de temps d'occupation de l'appareillage, également utilisé par d'autres personnes. Nous avons donc simplement laissé s'effectuer le transfert pendant une nuit.

Tableau IV : Faisceaux d'agrégats d'ions et paramètres utilisés pour le transfert de biomolécules

| Faisceau de transfert <sup>11</sup>              | Énergie des agrégats (keV) | Énergie par atome (eV/atome) | Intensité du faisceau primaire (nA) | Temps de transfert | Taille du raster (mm <sup>2</sup> ) | Densité de dose (C/mm <sup>2</sup> ) <sup>12</sup> |
|--------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Ar <sub>3000</sub> <sup>+</sup> (GCIB – 30 bars) | 10                         | 3,333                        | 1,75                                | 16 h               | 0,49                                | 2,06.10 <sup>-4</sup>                              |
| Bi <sub>x</sub> <sup>+</sup> (x=1 ; 3 ; 5 ; ...) | 30                         | Quelques keV                 | 33,00                               | 26 min             | 0,25                                | 2,06.10 <sup>-4</sup>                              |
| Ar <sub>330</sub> <sup>+</sup> (GCIB – 15 bars)  | 20                         | 60,606                       | 0,58                                | 15 h 30            | 0,49                                | <b>6,60.10<sup>-5</sup></b>                        |

<sup>11</sup> Voir remarques à la suite de ce tableau

<sup>12</sup> La densité de dose est le nombre de coulomb (dû à la charge des clusters d'ions primaires) qui a bombardé la cible pour effectuer le transfert. Il se calcule via la relation :  $Densité\ de\ dose = \frac{Intensité * temps}{taille\ du\ raster}$ , l'intensité étant exprimée en ampères (ou C/s), le temps en secondes et la taille du raster en mm<sup>2</sup>

### Partie III : Résultats et discussion

Tout au long de la partie II de ce mémoire, différentes techniques ont été présentées dans le but de caractériser des dépôts de protéines sur différents échantillons que l'on a nommés « de référence », mais également la méthode que nous voulons investiguer de façon à obtenir des couches minces de protéines.

Nous allons aborder dans cette partie les mesures et les résultats obtenus lors de l'application de ces techniques à des échantillons de référence. En premier lieu, l'influence du nettoyage des *wafers* va être discutée. Nous avons vu que ce nettoyage est un facteur qui va déterminer la quantité, mais aussi la manière avec laquelle les protéines vont être déposées sur le support. Pour ce faire, des mesures d'hydrophilicité par mesure de l'angle de contact entre une goutte d'eau et des *wafers* nus préparés selon divers protocoles ont été réalisées. De même, l'épaisseur de couches protéiques sur des *wafers* ayant été nettoyés selon ces mêmes méthodes a été mesurée par ellipsométrie, de manière à pouvoir comparer la quantité de lysozyme pouvant être déposée à la surface de ces supports.

La méthode la plus adéquate de nettoyage des *wafers* a ensuite été systématiquement utilisée pour l'obtention de couches minces de protéines, que ce soit pour l'élaboration des échantillons de référence ou pour l'obtention de couches minces de lysozyme par la méthode de transfert expliquée aux sections C et F. Dans un premier temps, des mesures par ellipsométrie ont été réalisées sur les échantillons de référence de manière à obtenir des informations sur la relation liant la concentration de la solution protéique déposée à la surface des *wafers* par *spin-coating* et l'épaisseur de la couche obtenue. En second lieu, ces différentes couches ont été caractérisées par ToF-SIMS de manière à obtenir des informations, grâce à l'utilisation de la PCA sur les spectres obtenus, qui seront ensuite utilisées pour évaluer le dépôt protéique obtenu sur les collecteurs. Différents faisceaux ont été utilisés à cette fin, mais nous verrons que seul l'un d'entre eux permet une séparation efficace d'une partie des échantillons de référence sur base des scores calculés par l'analyse en composantes principales.

Par la suite, des mesures spectrales ont été réalisées par imagerie SIMS sur des couches protéiques obtenues sur des collecteurs par transfert en phase gazeuse au moyen de trois faisceaux d'agrégats ionisés de différentes natures. Une analyse multivariée comparative entre les échantillons de référence et ceux obtenus sur des portions de collecteurs (ROI = Regions Of Interest) sera présentée de manière à discuter de l'adéquation de chacun des trois faisceaux de transfert.

## G. Influence du traitement de nettoyage appliqué sur les *wafers* de silicium

### G.1. Mesure de l'angle de contact

Des études préliminaires ont été réalisées sur des *wafers* de silicium de manière à évaluer la nécessité d'appliquer un traitement particulier sur ceux-ci, et d'un point de vue plus pragmatique de déterminer s'il est envisageable de s'affranchir du traitement au Piranha, dont la dangerosité a été évoquée précédemment.

Tableau V : Traitements appliqués aux *wafers* de silicium pour les tests de mesure d'hydrophilicité

| Traitement   | Piranha | Rinçage à l'isopropanol | UV-Ozone |
|--------------|---------|-------------------------|----------|
| Traitement 1 | NON     | OUI                     | NON      |
| Traitement 2 | NON     | OUI                     | OUI      |
| Traitement 3 | OUI     | OUI                     | NON      |
| Traitement 4 | OUI     | OUI                     | OUI      |

Pour ce faire, entre 3 et 4 mesures d'angle de contact ont été réalisées sur chacun des *wafers* traités selon le protocole repris dans le Tableau V. Les résultats de ces tests sont quant à eux repris dans la figure 30 ci-dessous.

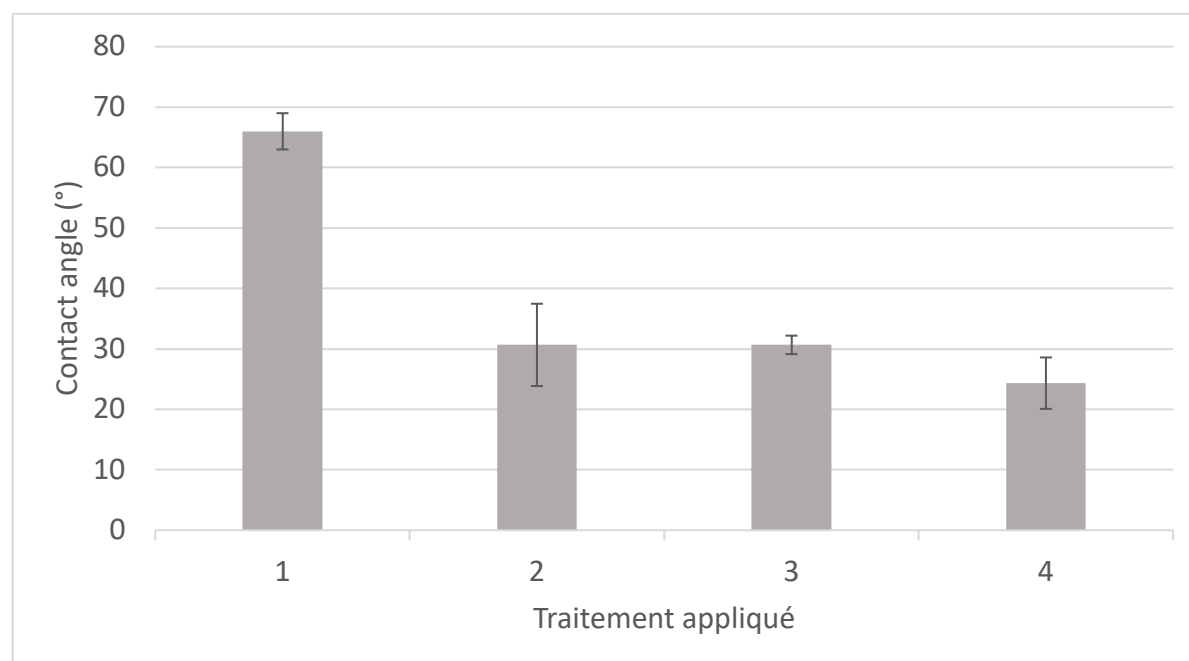


Figure 30 : Mesure de l'angle de contact effectuée sur des *wafers* de silicium nettoyés au moyen de différent(e)s (combinaisons de) traitement(s).

Alors que l'angle de contact est d'environ 65° pour le *wafers* traité uniquement à l'isopropanol (traitement 1), les trois autres combinaisons de traitements conduisent à un angle de contact situé aux alentours de 25-30°. Au vu de ces informations tirées de cette figure 30, nous pouvons simplement confirmer la nécessité d'appliquer un traitement nettoyant sur les *wafers*, qu'il s'agisse de la méthode 2, 3 ou 4. En effet, l'hydrophilicité du *wafers* est déjà fortement améliorée lorsque l'on utilise soit le mélange Piranha, soit l'UV-ozone, soit les deux en addition d'un rinçage à l'isopropanol.

Il semble cependant difficile de choisir parmi les méthodes 2 à 4 laquelle est la plus adéquate. A ce stade-ci, nous pourrions être tenté de nous affranchir du nettoyage au Piranha. Cependant, il est difficile de tirer des enseignements sans avoir testé au préalable ces méthodes de nettoyage lorsque ces *wafers* sont mis en présence de protéines.

## G.2. Évaluation de la qualité de nettoyage des *wafers* de silicium par ellipsométrie

Dans le but d'évaluer la nécessité d'appliquer les différents traitements repris dans le tableau V (page précédente), des mesures par ellipsométrie ont été effectuées sur des *wafers* à la surface desquels aucune solution protéique n'a été déposée, ainsi que sur des *wafers* sur lesquels a été déposée par *spin-coating* une solution de lysozyme concentrée à 5 mg/ml (ces résultats sont montrés dans la figure 31, page suivante). Le *spin-coating* a été effectué en utilisant les paramètres suivants : 1'30'' à 3000 rpm.

Pour les échantillons obtenus après nettoyage et en absence de protéine, l'épaisseur rapportée tient compte de la couche d'oxyde de silicium combinée à la présence de contaminants organiques à la surface du *wafers*. Nous remarquons que les couches les plus fines, qui sont donc a priori celles des *wafers* les mieux nettoyés, sont obtenues lorsque le traitement Piranha est appliqué (traitements 3 et 4). Il est toutefois difficile de conclure quant au résultat obtenu pour le traitement 2, c'est-à-dire pour un *wafers* ayant été traité uniquement par UV-ozone en plus du rinçage à l'isopropanol, étant donné l'erreur importante liée à cette mesure.

Après le dépôt par *spin-coating* d'une couche de protéine sur des *wafers* nettoyés, l'épaisseur totale mesurée représente la somme des épaisseurs de la couche d'oxyde (en plus des éventuels reliquats de contaminants) et de celle formée par les protéines. Nous observons une nette influence du traitement UV-ozone sur la valeur qui est mesurée. En effet, toujours selon la figure 31, nous remarquons que les couches les plus épaisses sont systématiquement obtenues lorsque le traitement UV-ozone est utilisé.

L'application d'un traitement UV-ozone permet donc l'obtention de couches plus épaisses de protéine, alors même que les mesures d'hydrophobicité de surface ne montraient pas de différence notable distinguant les *wafers* ayant été nettoyés selon les traitements 2 à 4. Notons également que le traitement UV-ozone ne semble pas être source de contamination additionnelle une fois que le lavage au Piranha a été effectué : en effet, il n'y a pas de différence significative pour les épaisseurs de couche d'oxyde entre les traitements 3 et 4 qui diffèrent entre eux par l'application (ou non) d'un traitement à l'UV-ozone.

Le protocole de nettoyage qui semble donc être le plus indiqué pour préparer les échantillons de référence combine un nettoyage à l'aide d'une solution Piranha, qui permet une meilleure élimination des contaminants de surface, et un traitement à l'UV-ozone qui permet l'obtention de couches plus épaisses de protéine.

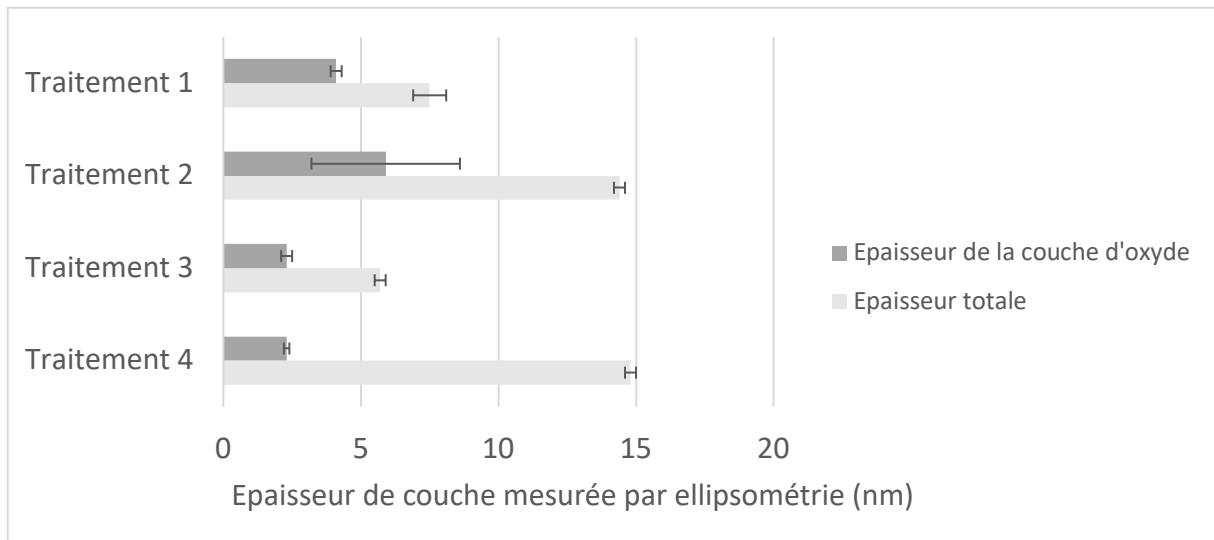


Figure 31 : Présentation des résultats obtenus en ellipsométrie pour des wafers nettoyés selon différents protocoles, avec lysozyme et sans lysozyme. Les barres d'erreurs représentent celles calculées par le modèle informatique utilisé et ne prennent pas en compte les éventuelles erreurs expérimentales liées à la préparation des échantillons.

## H. Caractérisation d'échantillons de référence

### H.1. Mesure de l'épaisseur de couches protéiques par ellipsométrie

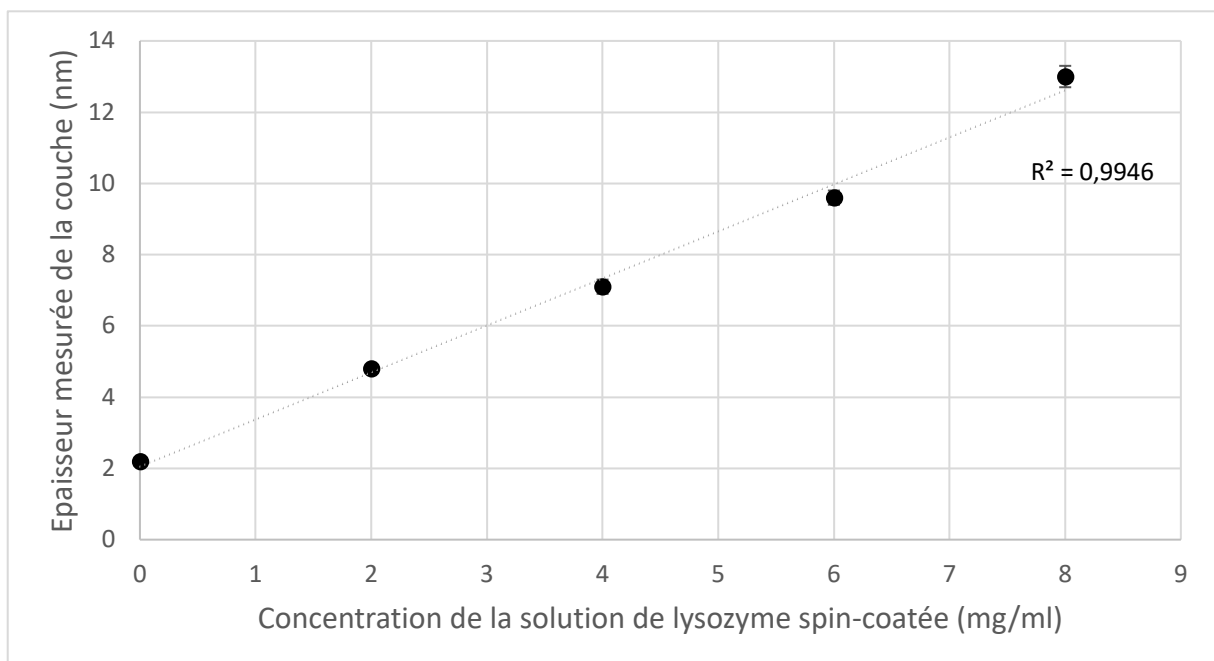


Figure 32 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie de la couche formée par les oxydes de silicium et par les protéines pour des échantillons préparés par spin-coating de solutions de lysozyme de concentration croissante (45', 4000 rpm)

De nouvelles mesures par ellipsométrie ont été réalisées dans le but de vérifier les épaisseurs de couches qui sont formées lorsqu'on crée des dépôts de protéines par *spin-coating* en utilisant des solutions de concentration croissante. Les *wafers* sur lesquels ont été obtenues

ces couches ont tous été traités au moyen d'une solution Piranha et d'un traitement UV-ozone. Les résultats des mesures sont représentés dans la figure 32 ci-dessus.

Pour la gamme de concentration protéique testée, une relation de proportionnalité est observée entre la concentration de protéine déposée sur le *wafer* et l'épaisseur de la couche de matière obtenue. Si l'on retranche l'épaisseur de la couche d'oxyde (environ 2 nm), une couche de 11 nm est obtenue lorsque l'on utilise une solution de 8 mg/ml, ce qui représente approximativement l'épaisseur qu'on peut obtenir en superposant 3 monocouches. Notons que le résultat obtenu pour le traitement 4 (figure 31) ne peut être lié avec ceux présentés à la figure 32 en raison des paramètres différents utilisés pour le *spin-coating* (1'30'' à 3000 rpm dans le premier cas, 45'' à 4000 rpm dans le second).

Nous retrouvons donc ici un lien de proportionnalité entre la concentration de la solution protéique spin-coatée et l'épaisseur de couche obtenue, ce qui avait déjà été évoqué de manière théorique lors de la section B.3.1. [17]. Au moyen de cette technique, il est donc en pratique possible d'obtenir des couches de lysozyme ayant une épaisseur contrôlée, en utilisant une solution de concentration adéquate et/ou en modifiant les paramètres utilisés lors du *spin-coating*.

## H.2. Analyse spectrale des échantillons par ToF-SIMS

Des analyses spectrales ont été effectuées, dans un premier temps, sur des échantillons de référence constitués de couches minces de lysozyme, lesquels ont été obtenus par *spin-coating* de solutions protéiques dont la concentration s'étale entre 0 et 8 mg/ml (soit entre 0 et 11 nm d'épaisseur). Pour ce faire, 3 types de faisceaux de *clusters* ionisés, ayant des propriétés énergétiques distinctes, ont été testés (se référer au tableau II, section E.3.3, pour la consultation des paramètres d'utilisation de chacun de ces faisceaux).

Pour chacune de ces natures différentes de faisceau d'analyse, une analyse en composantes principales des résultats a été réalisée. Nous allons en présenter les résultats dans cette section.

### H.2.1. Analyse multivariée des spectres issus de l'analyse ToF-SIMS des échantillons obtenus par spin-coating grâce au faisceau d'agrégats de $\text{Bi}_5^+$ 30 keV (30 keV)

Dans un premier temps, nous allons focaliser notre analyse sur les résultats obtenus lorsque l'on analyse les échantillons de référence à l'aide d'un faisceau de  $\text{Bi}_5^+$  (30 keV) composés d'atomes ayant une haute énergie cinétique. Les faisceaux d'argon feront l'objet d'une section à part entière à la suite de celle-ci (voir section H.2.2).

Si l'on s'intéresse dans un premier temps à l'évolution de la somme des intensités des ions secondaires issus de la fragmentation des acides aminés (Figure 33), nous remarquons une augmentation régulière du signal pour des concentrations en Lysozyme s'échelonnant de 0 à 2 mg/ml. Pour des concentrations plus élevées, l'augmentation du signal devient très faible et semble atteindre un plateau vers 5 mg/ml. Nous pouvons interpréter ce constat par le fait qu'à partir d'une certaine épaisseur de couche, le substrat ne contribue plus au signal, et donc que l'épaisseur de la couche n'a plus d'influence sur le signal obtenu. Les résultats obtenus

par l'ellipsométrie montrent en effet qu'à 4 mg/ml, la couche de protéines est épaisse d'environ 5 nm, ce qui est comparable à la profondeur du cratère provoqué par l'interaction entre un agrégat de  $\text{Bi}_5^+$  et une couche de matière [24]. Nous observons également une bonne reproductibilité des mesures pour les échantillons préparés avec des solutions de basse concentration.

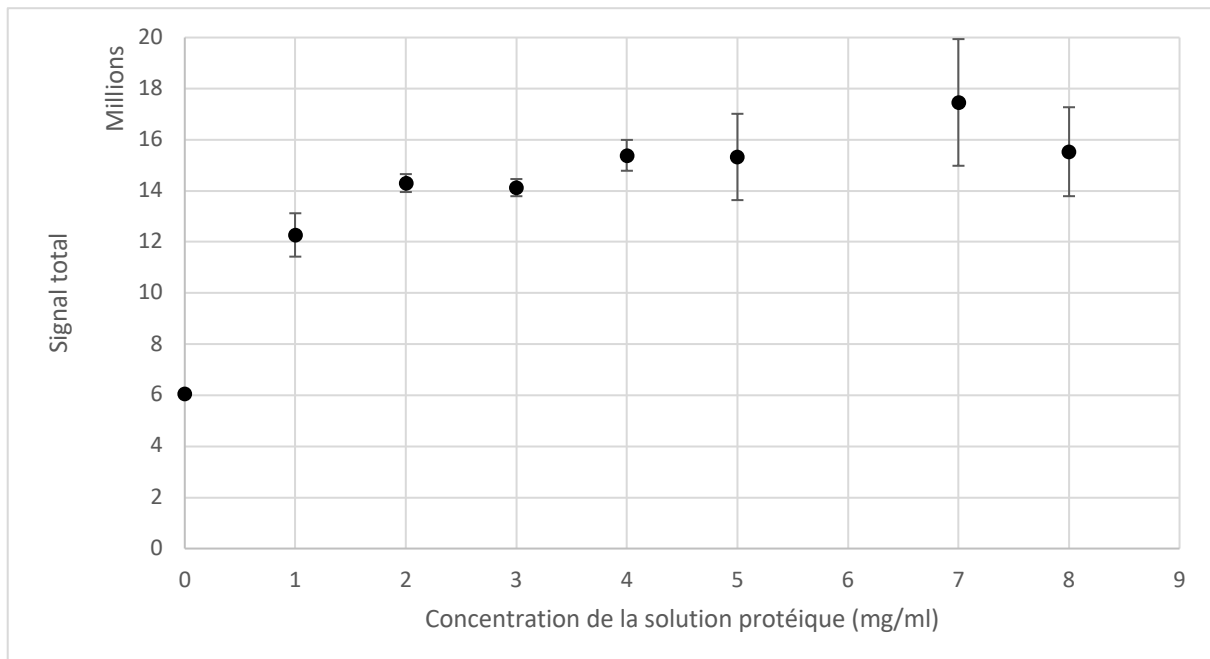


Figure 33 : Evolution de l'intensité totale des pics attribuables à la fragmentation des acides aminés obtenus par l'analyse des échantillons de références au moyen du faisceau de  $\text{Bi}_5^+$

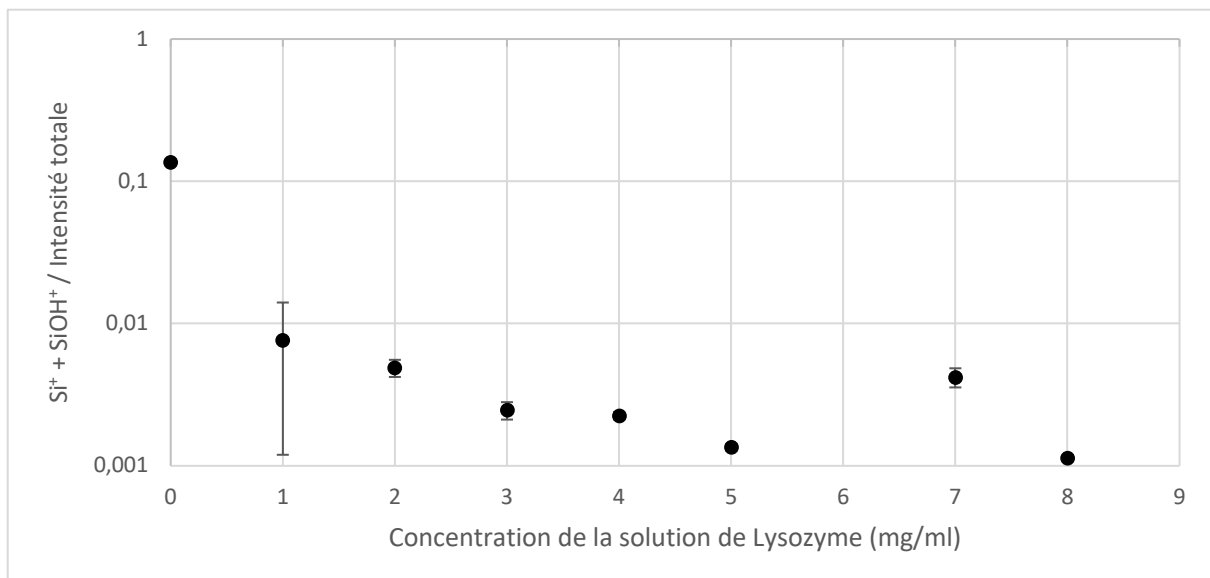


Figure 34 : Evolution de la somme des pics attribuables au support de silicium obtenus par l'analyse des échantillons de références au moyen du faisceau de  $\text{Bi}_5^+$

La quantité de lysozyme déposée sur le *wafer* peut également être mise en relation avec les signaux provenant du silicium constituant le support. La figure 34 montre l'évolution de la somme des signaux ( $\text{Si}^+ + \text{SiOH}^+$ ) (normalisée par l'intensité totale des spectres) issus de l'interaction du faisceau d'analyse avec le *wafer* de silicium en fonction de la concentration de

la solution protéique utilisée pour le *spin-coating*. Cette somme diminue fortement entre 0 et 3 mg/ml, puis reste à des valeurs faibles pour les concentrations plus élevées.

Les figures 33 et 34 nous permettent de constater que les signaux provenant de la fragmentation des protéines et ceux issus du *wafer* sont liés entre eux de manière inversement proportionnelle : plus la quantité de lysozyme déposée à la surface du *wafer* est élevée, plus le signal provenant des protéines l'est également et, *a contrario*, plus les signaux issus du silicium sont faibles. Cela étant, ces résultats ne nous donnent qu'un moyen de comparaison entre les échantillons d'un point de vue quantitatif. Ils ne permettent pas, par exemple, de donner des indications sur la conformation des protéines déposées ou éventuellement sur des phénomènes d'interaction entre les protéines. Pour tenter de répondre à ces interrogations, les différents spectres de références ont été comparés entre eux par PCA.

La figure 35 ci-dessous montre les différents scores associés à chaque spectre mesuré. Ces scores permettent de séparer entre eux les échantillons de référence selon deux composantes principales (PC) qui, une fois associées, permettent d'expliquer près de 92% de la variabilité entre les différents résultats. Le graphe des *loadings* associé est également montré à la figure 36 et permet la mise en évidence des principales contributions qui composent les deux PC's.

Concernant le graphe des scores tout d'abord, nous observons que PC1 semble permettre la séparation des échantillons de référence sur lesquels aucune protéine n'a été déposée (scores nettement négatifs pour PC1) de ceux sur lesquels du lysozyme a été déposé (scores proches de zéro ou positifs selon PC1). Les ellipses montrent l'intervalle de confiance (95%) associés aux scores provenant d'un même échantillon (ou combinaison d'échantillons préparés de façon identique). Pour des échantillons préparés avec des solutions protéiques plus élevées, nous observons une variation importante selon PC1 sans doute due au fait que la matière ne puisse pas former une couche protéique d'épaisseur homogène, mais également selon PC2.

La variation selon PC2 apparaissant uniquement au-delà d'une épaisseur de couche supérieure à environ 5 nm pourrait être due au fait que les contaminations présentes sur le substrat, qui sont visibles lors de l'analyse des échantillons les moins épais, ne sont plus visibles au-delà d'une épaisseur de couche supérieure à la profondeur du cratère provoqué par les ions primaires, qui est également de l'ordre de 5 nm. Nous observons grâce à la figure 36 que les pics  $C_7H_7^+$  et  $C_2H_3O^+$  sont inversement corrélés selon PC2. L'interprétation que l'on peut donner pour ceux-ci est qu'ils aient pour origine probable pour origine une contamination du *wafer* par des substances étrangères, qui ne sont pas des protéines (si c'était le cas, nous aurions obtenu une valeur pour PC2 élevée également pour le pic  $C_4H_8N^+$ ). Ces contaminants peuvent être par exemple des résidus d'acide gras ou d'autres contaminants organiques qui n'auraient pas été retiré lors du nettoyage du *wafer*.

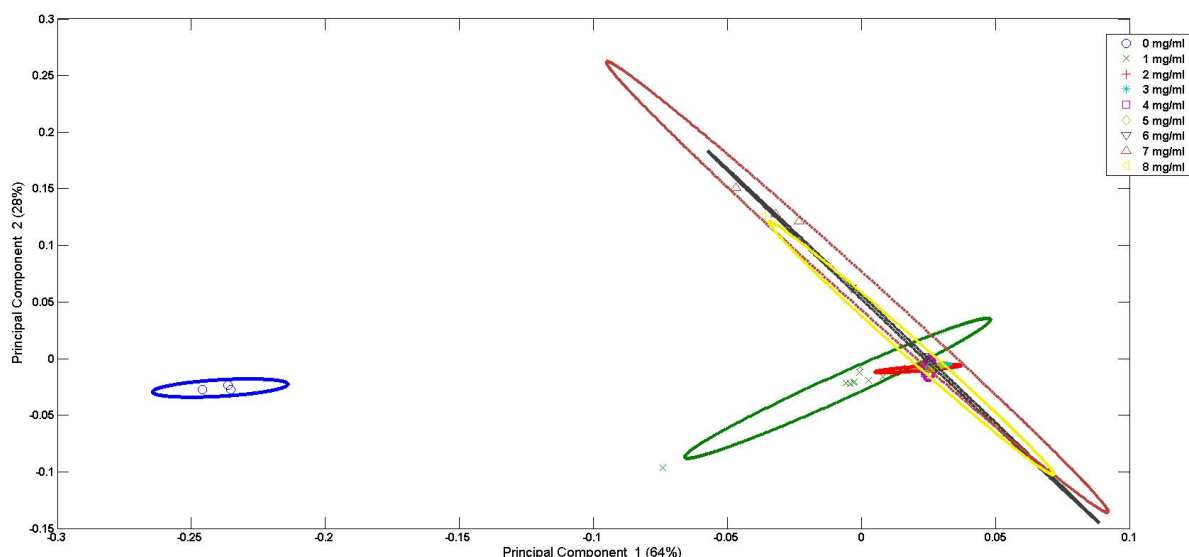


Figure 35 : Graphe des scores obtenus pour l'analyse spectrale à l'aide d'un faisceau de clusters  $Bi_5^+$  d'échantillons préparés par spin-coatin) cristallin de solutions de Lysozyme de différentes concentrations sur des wafers de silicium

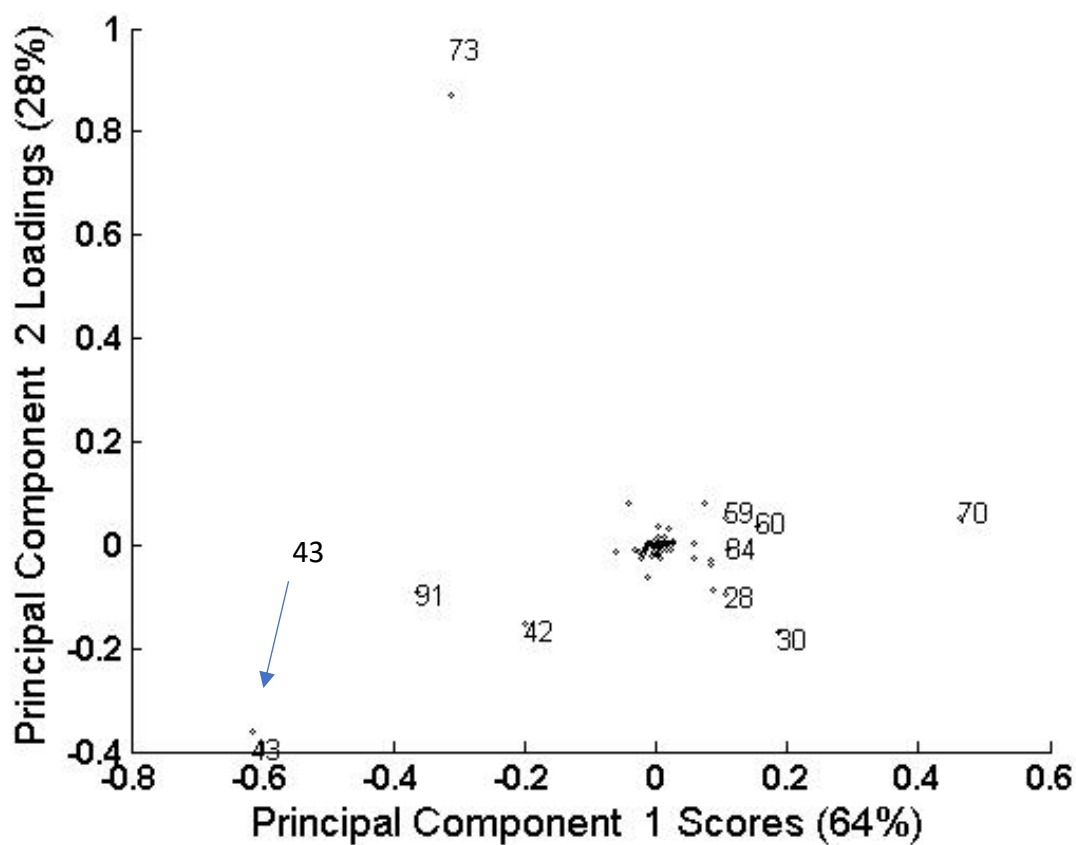


Figure 36 : Graphe des loadings obtenus pour l'analyse spectrale à l'aide d'un faisceau de clusters  $Bi_5^+$  d'échantillons préparés par adsorption forcée (spin-coating) sur des wafers de silicium cristallin de solutions de Lysozyme de différentes concentrations

### H.2.2. Analyse multivariée des spectres issu de l'analyse ToF-SIMS des échantillons obtenus par spin-coating grâce aux faisceaux d'agrégats d'Ar<sub>330</sub><sup>+</sup> 20 keV et d'Ar<sub>3000</sub><sup>+</sup> 10 keV

De manière à pouvoir évaluer l'influence de l'énergie cinétique des espèces composant le faisceau sur les spectres obtenus à partir des échantillons de référence, une expérience analogue à celle présentée à la section précédente a été réalisée en utilisant comme faisceau d'analyse des agrégats d'Ar<sub>330</sub><sup>+</sup> 20 keV et des agrégats d'Ar<sub>3000</sub><sup>+</sup> 10 keV. Pour rappel, ces faisceaux de *clusters* d'Argon se distinguent de celui du Bi<sub>5</sub><sup>+</sup> par une énergie cinétique par atome bien inférieure, ce qui nous a fait pressentir que les interactions de ces faisceaux avec la matière ne seront pas similaires dans les différents cas.

La figure 37 montre les scores obtenus pour l'analyse par PCA des spectres obtenus pour les échantillons de référence à l'aide du faisceau d'Ar<sub>330</sub><sup>+</sup>. Les conclusions que l'on peut en tirer sont maigres, étant donné que l'on obtient une première composante principale qui ne parvient qu'à séparer les spectres obtenus sur la référence « 0 mg/ml » de ceux des autres échantillons (sur lesquels du lysozyme a été déposé).

De plus, il y a une importante variabilité des spectres concernant l'échantillon « 0 mg/ml » selon PC2, ce qui peut laisser sous-entendre par exemple que la présence de contaminants à la surface du support peut mener à un manque important de reproductibilité des résultats.

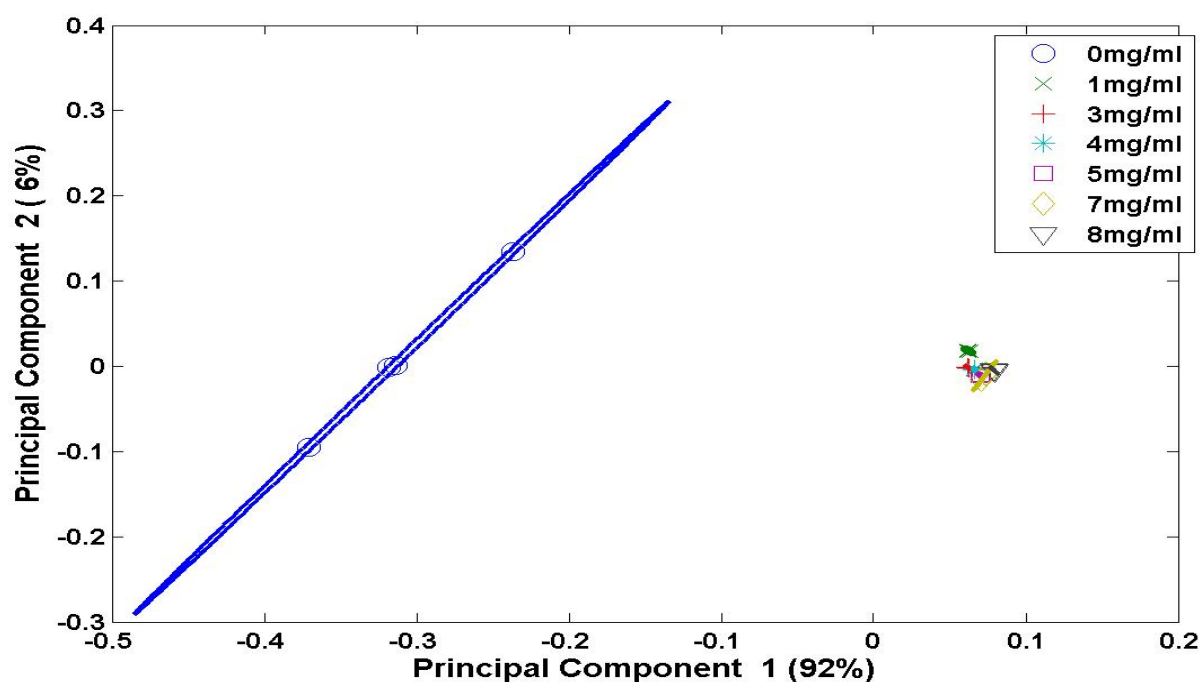


Figure 37 : Graphe des scores obtenus pour l'analyse spectrale à l'aide d'un faisceau de clusters Ar<sub>330</sub><sup>+</sup> d'échantillons préparés par adsorption forcée (spin-coating) sur des wafers de silicium cristallin de solutions de Lysozyme de différentes concentrations

Les mêmes conclusions peuvent vraisemblablement être appliquées pour le faisceau d'Ar<sub>3000</sub><sup>+</sup> au vu du graphe des scores montré à la figure 38, dans lequel les scores sont représentés uniquement selon PC1 qui explique à elle seule 98% de la variabilité entre les échantillons de référence. Nous observons également sur ce graphique une importante variabilité des

spectres mesurés sur l'échantillon de référence étiqueté « 0 mg/ml » et une très faible séparation selon PC1 des échantillons sur lesquels une solution protéique a été spin-coatée.

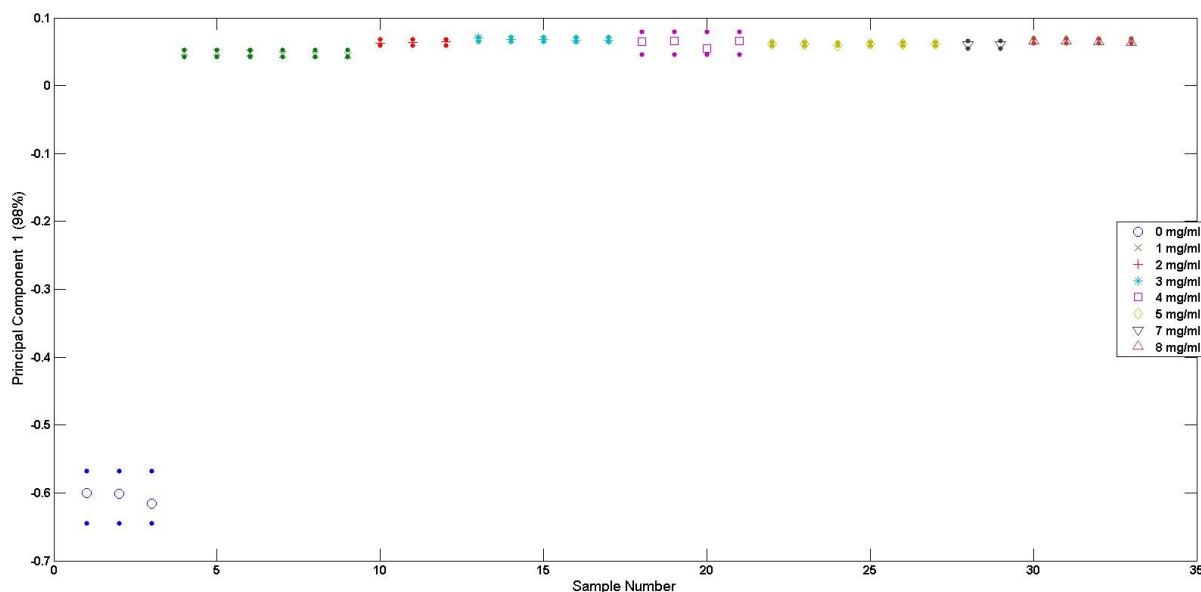


Figure 38 : Graphe des scores obtenus pour l'analyse spectrale à l'aide d'un faisceau de clusters  $Ar_{3000}^{+}$  d'échantillons préparés par adsorption forcée (spin-coating) sur des wafers de silicium de solutions de Lysozyme de différentes concentrations

### H.2.3. Conclusions sur l'adéquation de chacun des faisceaux d'analyse

Sur base de ce qui a été vu ci-dessus, l'utilisation d'un faisceau d'agrégats d'argon ne semble pas permettre d'obtenir des informations complémentaires à celles obtenues grâce au faisceau de bismuth. Leur énergie cinétique atomique étant plus faible que ceux du faisceau de bismuth, il paraît logique que la saturation du signal obtenu en SIMS soit atteinte pour des épaisseur de couche plus faible. De plus, un faisceau d'agrégats d'argon semble posséder une sensibilité plus élevée à la présence de contaminants.

Dans la suite du développement de ce mémoire, qui concerne cette fois-ci l'analyse spectrale des dépôts de protéines obtenus par transfert en phase gazeuse de protéines (section I), nous ne présenterons que les résultats obtenus suite à l'utilisation du faisceau d'analyse  $Bi_5^{+}$  en raison d'une sensibilité plus élevée, d'un temps d'analyse réduit et d'une meilleure habilité à séparer des échantillons selon les concentrations avec lesquelles ils ont été élaborés.

## I. Comparaisons entre les résultats obtenus par analyse au moyen du faisceau de $\text{Bi}_5^+$ issus du transfert moléculaire au moyen des 3 différents types de faisceau

Nous avons vu lors de la section E.2 que l'ellipsométrie n'est pas une technique pouvant être utilisée pour caractériser la couche de protéine obtenue sur les collecteurs en raison du fait qu'elle ne fournit qu'un résultat moyenné de l'épaisseur des couches de protéine obtenues, sans pour autant donner une idée de la répartition de la matière sur le collecteur.

Dans cette section, nous allons réaliser une analyse multivariée qui inclura les spectres obtenus sur les échantillons de référence et ceux obtenus par sélection de zones d'intérêts (ROI's) sur les images SIMS réalisées sur chacun des collecteurs après transfert de lysozyme au moyen de chacun des 3 faisceaux de *clusters* ionisés utilisés. En regard de la discussion qui a clôturé la section H.2, nous n'allons développer dans la suite de ce travail que les résultats d'analyse obtenus par imagerie SIMS au moyen du faisceau de  $\text{Bi}_5^+$ . Afin de ne pas ajouter une complexité supplémentaire à cette analyse, nous n'utiliserons que les échantillons de référence préparés avec les solutions protéiques de concentration égale à 0, 1, 2 et 4 mg/ml, pour lesquels l'influence expliquée par PC2 est modérée en comparaison avec des échantillons plus concentrés.

L'ensemble des imageries SIMS issues de l'analyse au moyen du faisceau d'analyse  $\text{Bi}_5^+$  des collecteurs après transfert du lysozyme au moyen des trois faisceaux d'ions est disponible à l'Annexe III. Pour chaque collecteur, une image représentant une somme de signaux attribuables à quelques pics caractéristiques de la fragmentation des protéines ( $\text{CH}_4\text{N}^+ + \text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+ + \text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$ ) et une image représentant la somme des signaux attribuables au support de silicium ( $\text{Si}^+ + \text{SiOH}^+$ ) est montrée.

### I.1. Evaluation de la matière transférée d'un point de vue semi-quantitatif au moyen de l'analyse spectrale

A l'instar de ce qui a été effectué pour les échantillons de référence, nous allons dans un premier temps évaluer la répartition de la matière d'origine protéique sur chacun des collecteurs. Afin d'apporter des éclaircissements par rapport à cette problématique, nous allons nous appuyer sur les figures 39 et 40, qui montrent, d'une part, l'évolution de la somme des signaux attribuables à la fragmentation des acides aminés et, d'autre part, l'évolution de la somme des signaux provenant de l'interaction du faisceau d'analyse avec le *wafer* de silicium.

Sur la figure 39, nous observons que la somme des signaux issus de la fragmentation des protéines sont faibles pour les collecteurs issus des transferts de lysozyme au moyen des faisceaux d' $\text{Ar}_{330}^+$  et de  $\text{Bi}_x^+$ , tandis qu'elle s'approche des valeurs obtenues pour les échantillons de référence « 1 mg/ml », « 2 mg/ml » et « 4 mg/ml » pour le faisceau  $\text{Ar}_{3000}^+$  sur une zone du collecteur située à proximité de la cible. Ce signal tend toutefois à diminuer au-delà d'une distance égale à environ 4 mm. Une évolution analogue est observée sur la figure 40 montrant l'évolution du signal provenant du *wafer* de silicium, où l'on observe cette fois-ci de faibles valeurs pour les distances 0-4 mm sur le *wafer* ayant collecté la matière transférée au moyen du faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$ , tandis que le support demeure visible sur l'entièreté des collecteurs résultant du transfert de lysozyme au moyen du faisceau de bismuth. Entre ces

deux courbes, nous observons une évolution intermédiaire pour le collecteur obtenu à l'aide du faisceau d' $\text{Ar}_{330}^+$ . Pour les distances les plus élevées, nous observons que les courbes se rejoignent, ce qui montre que la matière semble être déposée à des distances relativement courtes.

Ces courbes indiquent donc, premièrement, que le dépôt de protéines sur le collecteur est fonction du faisceau de transfert utilisé. La couche protéique obtenue à l'aide du faisceau le moins énergétique ( $\text{Ar}_{3000}^+$  10 keV) semble donner, pour des distances d'environ 0 à 5 mm, des spectres d'analyse ressemblant à ceux que l'on a obtenus pour des couches minces déposées par *spin-coating*. En revanche, les spectres obtenus sur les surfaces ayant collecté la matière issue des transferts réalisés au moyen des faisceaux d'agrégats  $\text{Bi}_5^+$  30 keV et  $\text{Ar}_{330}^+$  20 keV semblent indiquer que le dépôt obtenu ne s'apparente pas à une couche mince de lysozyme ayant les mêmes caractéristiques qu'une couche de lysozyme déposée par *spin-coating*. Au contraire, les signaux semblent se rapprocher de ceux obtenus sur le *wafer* sur lequel aucune couche protéique n'a été déposée.

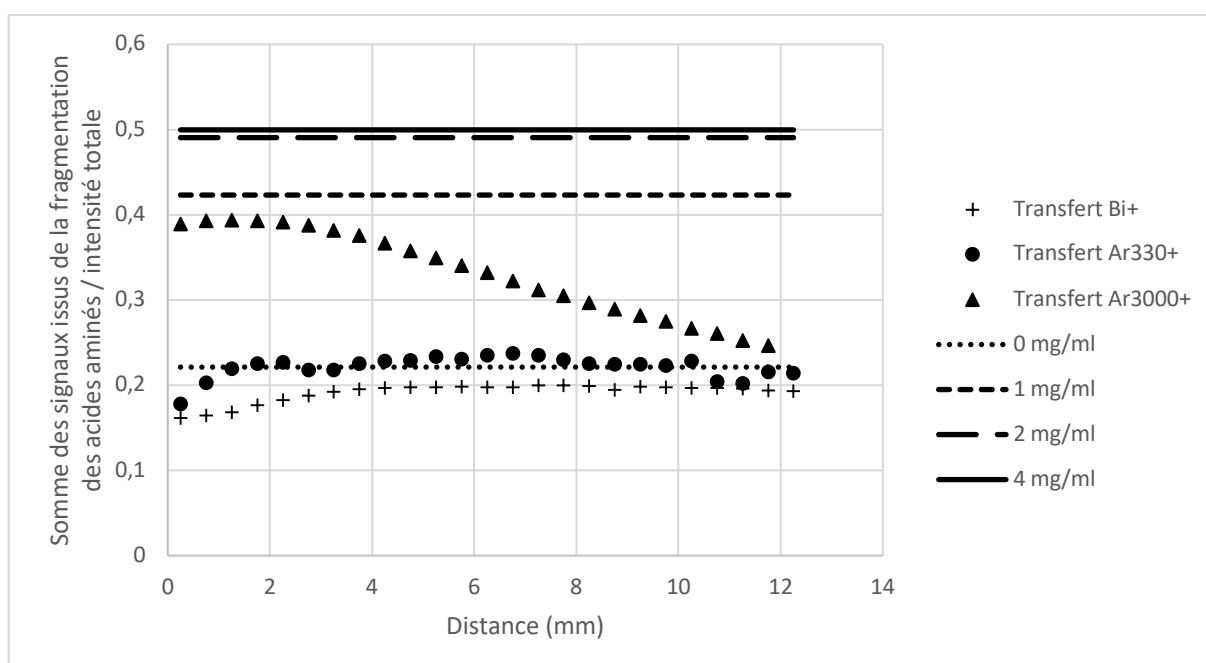


Figure 39 : Evolution de la somme des pics issus de la fragmentation des acides aminés normalisés par l'intensité totale pour les spectres extraits d'une imagerie SIMS des trois collecteurs réalisée à l'aide d'un faisceau de  $\text{Bi}_5^+$  (après transferts du lysozyme au moyen d'un faisceau de  $\text{Bi}_5^+$ ,  $\text{Ar}_{330}^+$  et  $\text{Ar}_{3000}^+$ ) en fonction de la distance moyenne par rapport à la cible du spectre extrait sur le collecteur (ROI). Les lignes verticales montrent la valeur moyenne de cette somme pour les échantillons de référence préparés avec 0, 1, 2 et 4 mg/ml

Sur base des figures 39 et 40, nous pouvons affirmer qu'un transfert de protéines ayant une structure similaire à celles adsorbées à la surface des échantillons spin-coatés n'est pas réalisable avec le faisceau de  $\text{Bi}_x^+$ . Les résultats obtenus pour le transfert réalisé avec les agrégats  $\text{Ar}_{330}^+$  sont difficiles à interpréter, étant donné que ce transfert n'a pas été mené à son terme. Pour le faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$ , il semblerait que la constitution d'une couche protéique d'une épaisseur de plusieurs nm soit possible.

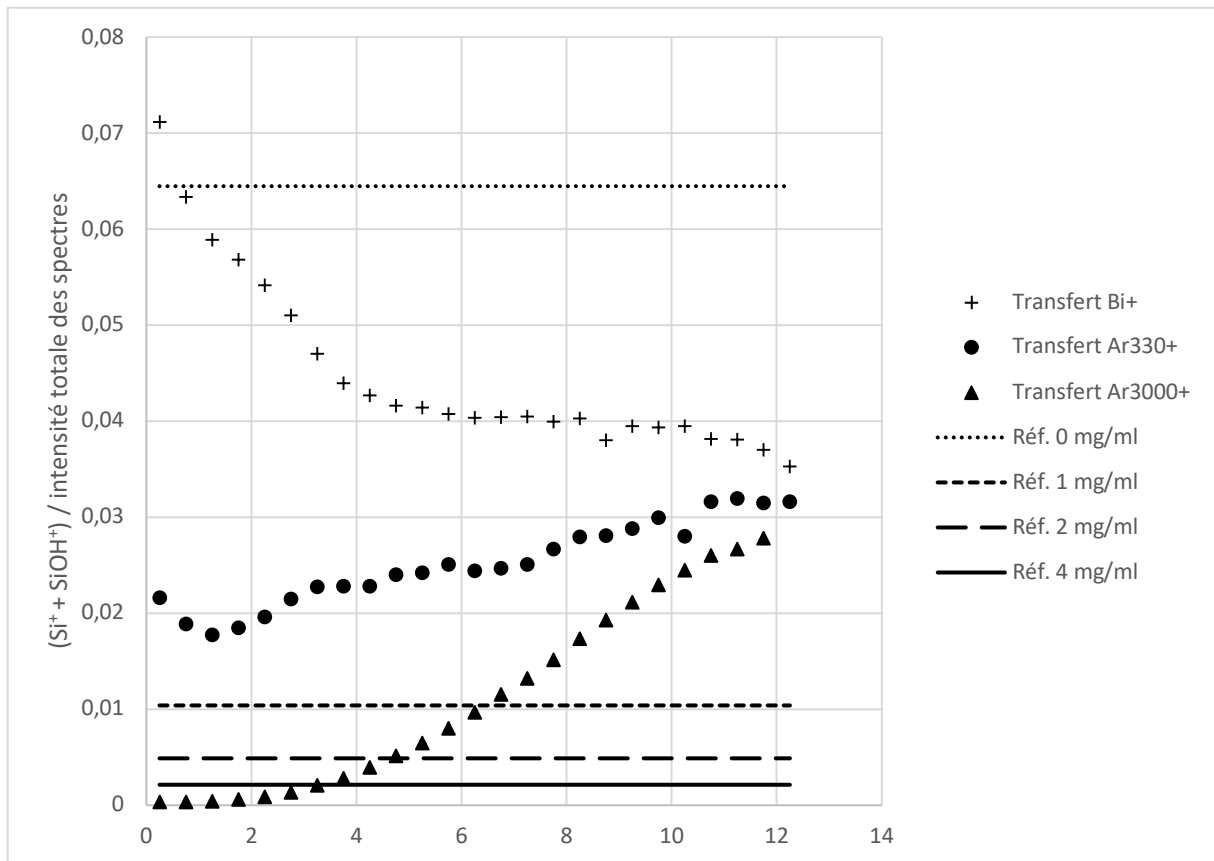


Figure 40 : Evolution de la somme des pics  $Si^+$  et  $SiOH^+$ , issus de l'interaction du faisceau primaire d'analyse avec le wafer de silicium, normalisée par l'intensité totale pour les spectres extraits d'une imagerie SIMS des trois collecteurs réalisée à l'aide d'un faisceau de  $Bi_5^+$  (après transferts du Lysozyme au moyen d'un faisceau de  $Bi_x^+$ ,  $Ar_{330}^+$  et  $Ar_{3000}^+$ ) en fonction de la distance moyenne par rapport à la cible du spectre extrait sur le collecteur (ROI). Les lignes verticales montrent la valeur moyenne de cette somme pour les échantillons de référence préparés avec 0, 1, 2 et 4 mg/ml

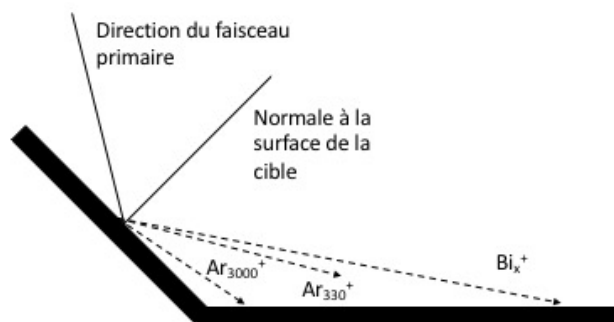


Figure 41 : Angle des particules secondaires par rapport à la normale de la cible bombardée en fonction de l'énergie du faisceau de transfert utilisé (d'après [26])

particules émises par les faisceaux d' $Ar_{330}^+$  ou de  $Bi_x^+$  seront éjectées selon un angle plus fermé et se déposeront donc plus loin sur le collecteur.

Dans la littérature, il a été mis en évidence que l'angle des particules éjectées de la cible lorsqu'un faisceau de *cluster* primaire bombarde le dépôt de protéine est dépendant de l'énergie cinétique des atomes composant les agrégats [26]. Les particules éjectées par interaction du faisceau primaire  $Ar_{3000}^+$  sont éjectées selon un angle d'incidence plus grand (par rapport à l'axe normal au plan de la cible) celles issues de l'interaction avec un faisceau plus énergétique (figure 41). En revanche, les

I.2. Evaluation de la matière transférée au moyen de l'analyse multivariée effectuée sur les données spectrales récoltées

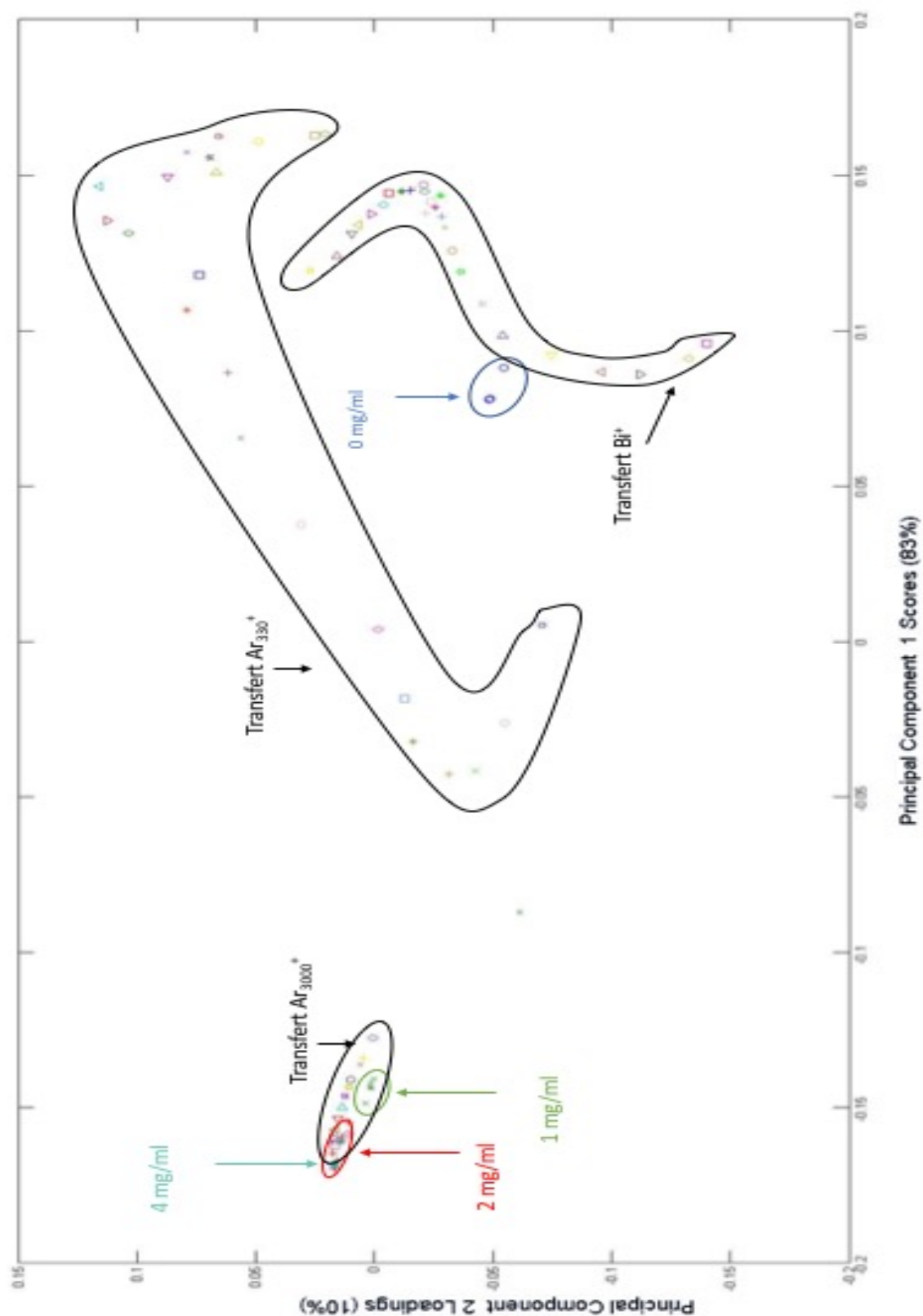


Figure 42 : Scores obtenus par PCA comparative des spectres issus de l'analyse à l'aide du faisceau de  $Bi_5^+$  des échantillons de référence et du transfert de Lysozyme au moyen de trois types de faisceau de transfert différents ( $Bi_5^+$ ,  $Ar_{330}^+$  et  $Ar_{3000}^+$ )

Toutefois, les signaux représentés sur les figures 39 et 40 ne permettent pas de répondre à des questions d'ordre qualitatif par rapport à la matière qui a été déposée. Comme déjà évoqué lors de la section C.1, le transfert de biomolécules peut être parfois accompagné d'une fragmentation de celles-ci, ce qui est contraire à l'objectif que l'on souhaite atteindre.

Dans cette section, nous allons présenter et discuter les résultats d'une analyse multivariée (par PCA) qui prend en compte à la fois les échantillons de référence, mais également les spectres extraits de l'ensemble des 3 imageries SIMS réalisées sur les 3 collecteurs différents. Grâce au graphe des scores associé à celle-ci (figure 42, page précédente), une analyse multivariée par PCA a permis de séparer de façon systématique les spectres selon deux composantes principales. Par souci de lisibilité de ce graphe, les différents scores associés à chacun des échantillons (soit ceux de référence, soit ceux extraits de l'imagerie SIMS des collecteurs) ont été entourés par groupes représentatifs d'un échantillon analysé : il ne s'agit pas de la représentation des intervalles de confiance obtenus sur les différents spectres associés, comme cela a été fait pour les échantillons de référence analysés lors de la partie II.

La première de ces deux composantes explique 83% de la variabilité entre les différents spectres obtenus et permet de séparer clairement les échantillons de référence sur lesquels une couche protéique a été obtenue par *spin-coating* (« 1mg/ml », « 2 mg/ml » et « 4 mg/ml ») de celui ne contenant pas une telle couche (« 0 mg/ml »). La seconde composante, quant à elle, a permis de fournir un indicateur de la différence de composition de surface différenciant les ROI extraits sur les collecteurs par rapport aux échantillons de référence.

On peut voir également sur le graphe des scores que cette première composante permet aussi de séparer les spectres issus des collecteurs en fonction du faisceau de transfert utilisé. La séparation selon PC1 semble nette en ce qui concerne le transfert à l'aide du faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$  vis-à-vis des deux autres types de faisceau de transfert.

La discrimination des scores selon PC1 n'est cependant pas aussi évidente concernant les deux autres types de faisceau. Mais cela peut être expliqué par le fait que, pour des raisons pratiques, le transfert de lysozyme au moyen du faisceau d' $\text{Ar}_{330}^+$  a été effectué durant une durée qui n'a pas permis d'égaliser la densité de dose atteinte pour les deux autres types faisceaux de transfert (voir tableau IV, section F.2), avec pour conséquence une probable diminution de la quantité de protéine potentiellement transférée. Nous pourrions donc imaginer qu'un transfert réalisé avec le faisceau d' $\text{Ar}_{330}^+$  et employant une densité de dose égale à celle utilisée pour les deux autres faisceaux aurait mené à un déplacement des scores qui y sont associées vers la gauche, s'alignant donc davantage sur la caractéristique des échantillons qui est expliquée par PC1.

A partir de ce même graphique des scores, nous pouvons déceler une autre caractéristique qui distingue très clairement le transfert réalisé avec le faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$  des autres types de transfert : les scores obtenus pour le premier de ces faisceaux ont des coordonnées selon PC2 qui s'étendent dans un intervalle bien plus étroit que cela n'est le cas pour les autres faisceaux de transfert. La quantité de matière ainsi que la composition de la couche protéique obtenue pourraient donc, au vu de ce constat, être caractérisée par une homogénéité de surface bien plus élevée que celles des couches constituées à l'aide du faisceau de Bismuth. De plus, cet

intervalle est identique à celui que l'on pourrait construire pour les échantillons de référence « 1 mg/ml », « 2 mg/ml » et « 4 mg/ml ».

L'analyse multivariée présentée ci-dessus indique donc que la couche protéique obtenue par transfert moléculaire au moyen d'un faisceau d'argon peu énergétique pourrait être caractérisée par une structure moléculaire proches de celles obtenues par dépôt de Lysozyme à la surface d'un *wafer* à l'aide de la technique du *spin-coating*. Par ailleurs, le transfert réalisé à l'aide d'un faisceau de bismuth serait très peu efficace et mènerait à un état proche de celui d'un échantillon blanc (« 0 mg/ml »), recouvert toutefois de certaines traces d'origine protéique (une quantité infime de lysozyme ou de fragments).

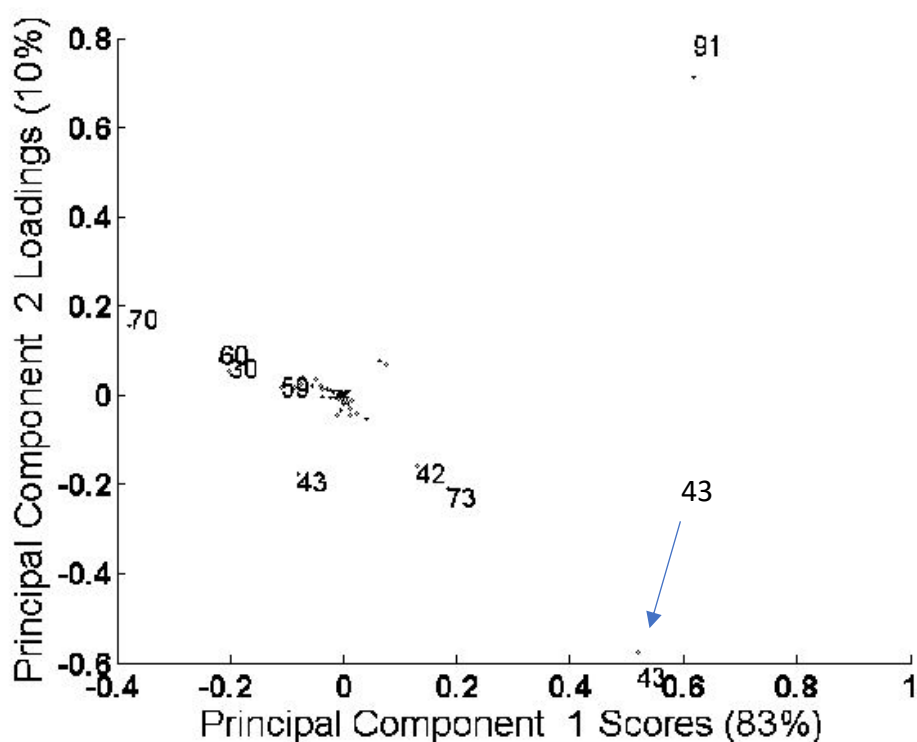
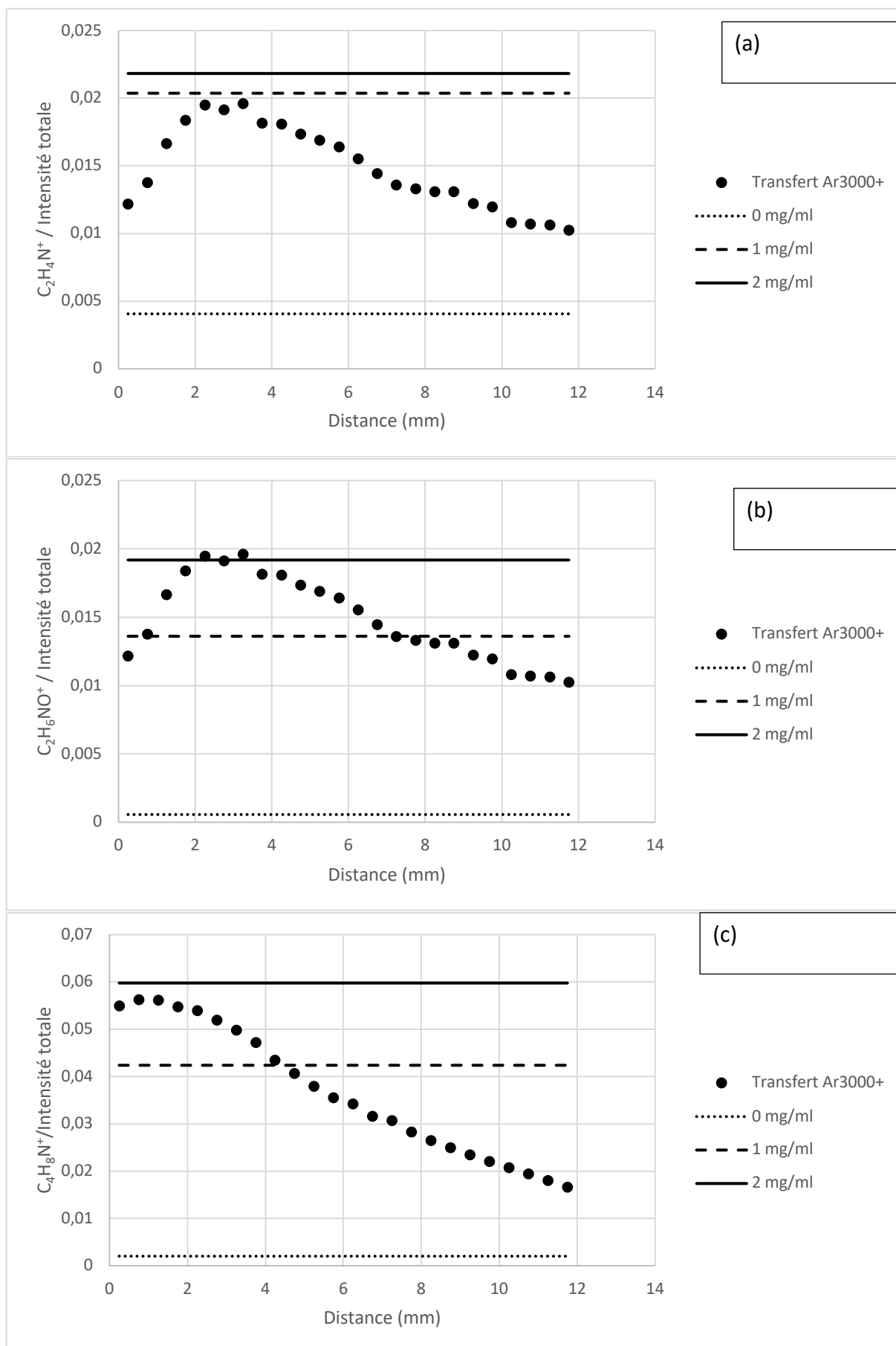
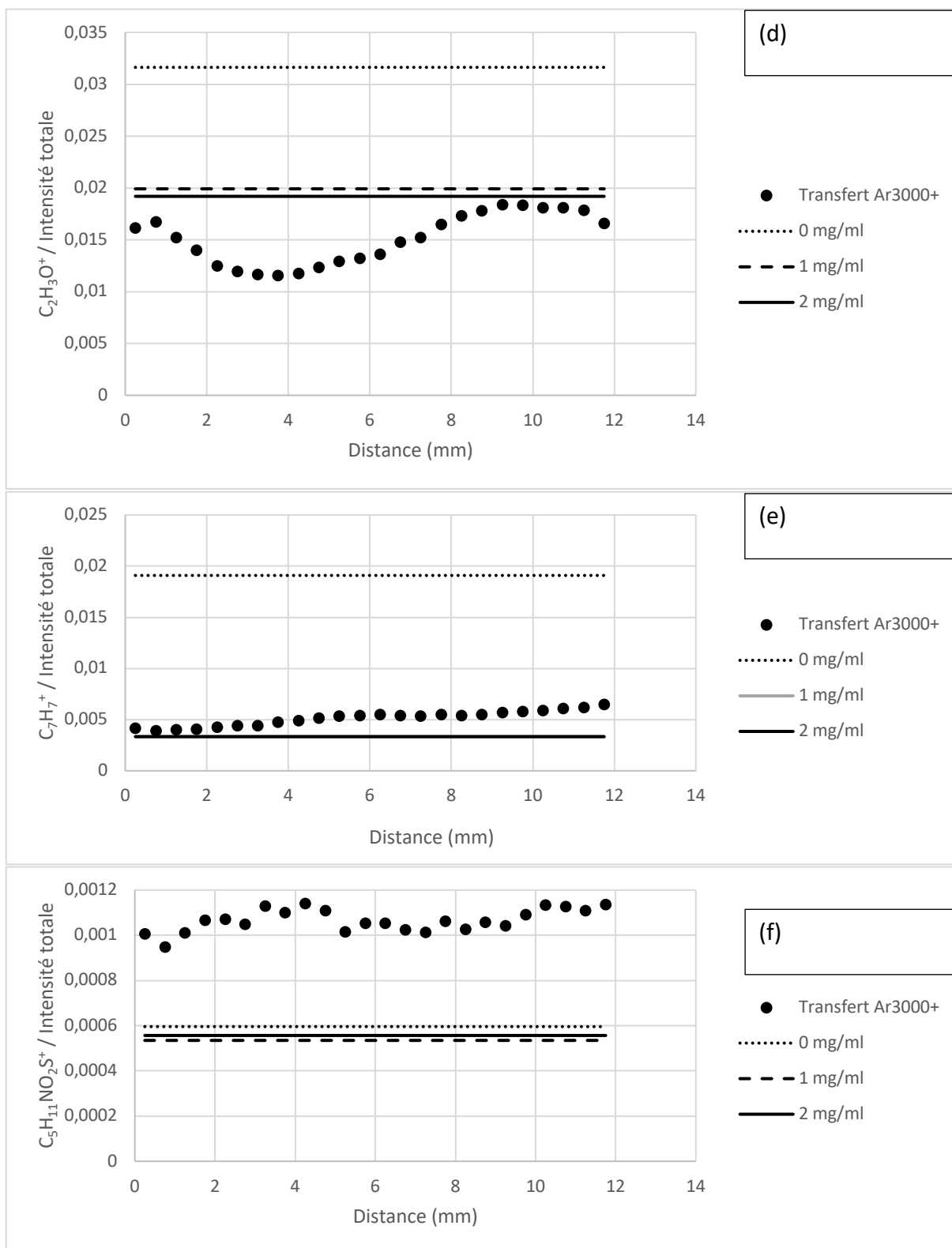


Figure 43 : Loadings obtenus par PCA comparative des spectres issus de l'analyse à l'aide du faisceau de  $Bi_5^+$  des échantillons de référence et du transfert de lysozyme au moyen de trois types de faisceau de transfert différents ( $Bi_x^+$ ,  $Ar_{330}^+$  et  $Ar_{3000}^+$ )

Le graphique des loadings (figure 43) ci-dessus montre les contributions qui composent majoritairement PC1 ( $C_4H_8N^+$ ;  $C_7H_7^+$  et  $C_2H_3O^+$ ) et celles qui composent majoritairement PC2 ( $C_2H_3O^+$  et  $C_7H_7^+$ ) pour les résultats obtenus sur les échantillons de référence et pour les spectres extraits sur les ROI sélectionnées sur l'imagerie SIMS du collecteur utilisé lors du transfert de lysozyme à l'aide du faisceau d'agrégats  $Ar_{3000}^+$ . D'autres contributions, qui semblent être moins importantes sont également indiquées. Les courbes de la figure 44 montrent l'évolution de ces contributions en fonction de la distance de la région d'intérêt par rapport à la cible.





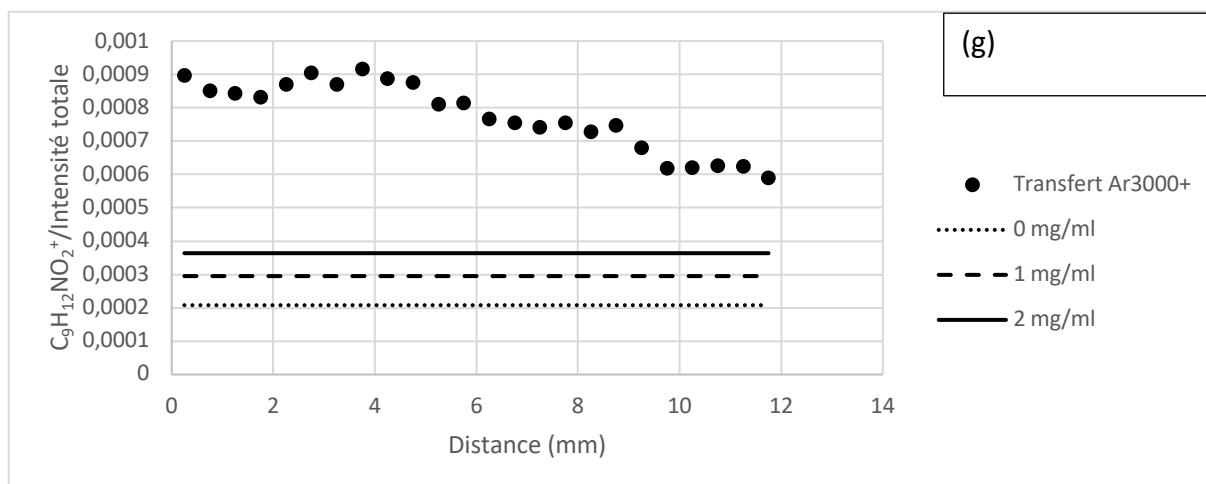


Figure 44 : Graphiques (a) à (g) montrant l'évolution de quelques pics (normalisés par l'intensité des spectres) issus des spectres extraits sur les ROI's de l'imagerie SIMS obtenue par analyse au moyen d'un faisceau  $Bi_5^+$  du collecteur après transfert du Lysozyme par le faisceau  $Ar_{3000}^+$  10 keV

Les trois premiers de ces graphiques (figure 44 (a), (b) et (c)) représentent respectivement cette évolution pour les fragments d'acide aminé  $C_2H_4N^+$  ( $m/z = 42$ ) ;  $C_2H_6NO^+$  ( $m/z = 60$ ) et  $C_4H_8N^+$  ( $m/z = 70$ ). Sur le graphe des loadings, ces pics se positionnent autour d'une valeur de PC2 proche de 0. Ces trois contributions montrent des évolutions plutôt similaires : les spectres extraits sur les régions d'intérêt situées proche de la cible semblent donner des résultats spectraux semblables à ceux obtenus sur les échantillons de référence pour les pics considérés. Il s'agit d'évolutions se rapprochant de celle obtenue à la figure 39, ce qui tend à montrer que les signaux obtenus pour ces pics sont proportionnels à l'épaisseur du dépôt. On pourrait donc, sur base de ces contributions, affirmer que le dépôt obtenu à une distance inférieure à 4 mm au moyen du faisceau d' $Ar_{3000}^+$  possède une structure moléculaire probablement proche de celle des échantillons de référence.

Les deux graphiques suivant (figure 44 (d) et (e)) représentent les évolutions des pics  $C_2H_3O^+$  ( $m/z = 43$ ) et  $C_7H_7^+$  ( $m/z = 91$ ), qui sont inversement corrélés entre eux via PC2. Pour ces deux pics, nous observons une dépendance moins marquée que précédemment vis-à-vis de la distance par rapport à la cible. Toutefois, on observe à nouveau une certaine ressemblance par rapport aux échantillons de référence « 1 mg/ml » et « 2 mg/ml ». La stabilité apparente du signal est probablement attribuable à la présence de contaminants déjà présent à la surface des collecteurs avant que le transfert de protéine ne soit réalisé (voir section H.2.1).

En revanche, les courbes (f) et (g) représentent l'évolution des pics  $C_5H_{11}NO_2S^+$  ( $m/z = 150$ ) et  $C_9H_{12}NO_2$  ( $m/z = 166$ ) situés au centre du graphe des loadings (PC1 et PC2 proches de zéro) ce qui signifie à première vue qu'ils ne participent pas de manière significative à l'explication de la variabilité entre les spectres obtenus. Il semble difficile d'interpréter ces graphes, en raison du fait que les valeurs obtenues sont très différentes de celles que nous avons récoltées sur les échantillons de référence.

### I.3. Conclusions sur l'adéquation de chacun des faisceaux de transfert

Dans la section I.2, nous avons discuté, sur base d'une analyse comparative par PCA, l'efficacité de chacun des faisceaux de transfert utilisés. Les principaux résultats sont résumés ci-dessous.

Pour les faisceaux d'agrégats  $\text{Bi}_x^+$  (30 keV) et  $\text{Ar}_{330}^+$  (20 keV), les dépôts obtenus ne semblent pas permettre la formation d'une couche protéique épaisse, constituée de protéines ayant une structure maintenue. Le collecteur qui en résulte est probablement recouvert d'une couche de contaminants qui n'ont pas été extraits du *wafer* par le traitement de nettoyage, auxquels s'ajoute éventuellement un dépôt ultra-mince de fragments d'origine protéique. Il est toutefois raisonnable de penser qu'un dépôt plus épais aurait pu être obtenu si l'on avait permis au « transfert  $\text{Ar}_{330}^+$  » de s'opérer de manière à ce que la densité de dose d'ions primaires soit similaire à celle utilisée pour les deux autres faisceaux.

Le faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$  a permis, *a contrario*, d'obtenir une couche de matière plus épaisse, probablement constitué de plus grand fragments protéiques (voire, nous l'espérons, de molécules entières ayant gardé la même structure et la même conformation). La constitution d'une couche plus épaisse (ce qui a été expliqué par des valeurs de PC1 négatives) semble également aller de pair avec une diminution des signaux originaires des contaminants de surface déposés avant le début du transfert (d'où la faible valeur observée sur PC2 pour le groupement de scores associé à ce transfert).

## Partie IV : Conclusions et perspectives

### Conclusions

L'objectif principal de ce mémoire a été de discuter la possibilité de transférer des biomolécules par l'utilisation de différents faisceaux d'agrégats ionisés, se différenciant entre eux par des énergies par atome d'ordres de grandeur différents. Dans le cadre de ce travail, les faisceaux d'agrégats testés pour réaliser les différents transferts sont ceux de Bismuth (principalement  $\text{Bi}^+$ ), d' $\text{Ar}_{330}^+$  et d' $\text{Ar}_{3000}^+$ .

Dans un premier temps, nous avons investigué l'influence de la méthode de nettoyage à employer pour préparer les *wafers* sur lesquels seront élaborées les couches protéiques (au moyen de la technique du *spin-coating* pour les échantillons de référence, ou par transfert de matière au moyen des faisceaux d'ions). À partir de mesures de l'hydrophilicité de la surface par détermination de l'angle de contact et par ellipsométrie, nous sommes parvenus à la conclusion qu'un protocole de nettoyage combinant un traitement à l'aide d'une solution Piranha et un traitement UV-ozone paraît être le plus adéquat parmi ceux que nous avons testés.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de couches minces de lysozyme obtenues par la technique du *spin-coating*. Les différents échantillons analysés, dits « de référence », se distinguent entre eux par la concentration de la solution protéique utilisée pour l'élaboration de ceux-ci. Les mesures d'épaisseur de couches protéiques obtenues, réalisées par ellipsométrie, ont montré une corrélation parfaite entre la concentration de la solution protéique utilisée pour préparer les échantillons de référence et l'épaisseur de la couche protéique formée.

Par ailleurs, la surface des échantillons spin-coatés a été caractérisée par ToF-SIMS. À cette fin, plusieurs types de faisceau d'agrégats ionisés ont été utilisés :  $\text{Bi}_5^+$  (30 keV),  $\text{Ar}_{330}^+$  (20 keV) et  $\text{Ar}_{3000}^+$  (10 keV). Une analyse multivariée des spectres issus de ces analyses ont permis d'identifier le faisceau de bismuth comme celui à utiliser préférentiellement pour la caractérisation des échantillons, en raison de son habilité à discriminer les spectres selon l'épaisseur des couches protéiques (en tout cas pour celles dont l'épaisseur n'excède pas environ 5 nm) et d'une sensibilité probablement moindre vis-à-vis de la présence d'éventuels contaminants d'origine non-protéique sur les *wafers* avant spin-coating.

La section I de ce mémoire a permis d'évaluer l'efficacité de chaque faisceau de transfert testé au moyen d'une analyse comparative des spectres issus des échantillons de référence, d'une part, et de ceux extraits sur des régions d'intérêt (ROI) sélectionnées sur une imagerie SIMS des trois différents collecteurs, chacun étant associé à un faisceau de transfert distinct.

En vue de comparer les dépôts obtenus sur les différents collecteurs, un regroupement de l'ensemble des spectres obtenus comme expliqué au paragraphe précédent a été interprété par PCA, grâce à laquelle nous avons mis en évidence une nette influence du faisceau utilisé pour le transfert sur le dépôt d'origine protéique obtenu. D'un point de vue quantitatif, tout d'abord, un lien évident (à densité de dose égale concernant le faisceau d'agrégats primaires) semble établi entre l'énergie des atomes composant les *clusters* et l'épaisseur du dépôt

obtenu. Les agrégats les moins énergétiques parmi ceux testés, à savoir  $\text{Ar}_{3000}^+$ , semblent permettre la construction de couches plus épaisses, ce qui a été expliqué par le fait que la matière désorbée de la cible était éjectée selon un angle permettant un dépôt en couches plus épaisses (sur base de l'article [26]). Par ailleurs, comme attendu, il a été montré que les résultats d'analyse spectrale effectuée sur le collecteur obtenu après transfert du lysozyme au moyen du faisceau d' $\text{Ar}_{3000}^+$  étaient proches de ceux obtenus sur les échantillons de référence en comparaison avec les collecteurs obtenus au moyen des autres types de faisceaux.

### Perspectives

Ce mémoire a été proposé dans le cadre d'un projet de recherche plus vaste, impliquant différents chercheurs, dont la finalité est de développer un protocole et un appareillage *ad hoc* permettant d'implémenter cette technique à une échelle plus importante (et pourquoi pas industrielle). Ce projet n'ayant été initié que récemment, la recherche réalisée sur le sujet par les doctorants en charge du projet n'en est encore qu'à un stade exploratoire.

Dans un avenir proche, différents faisceaux d'agrégats vont être élaborés de manière à réduire davantage l'énergie par atome les caractérisant (une énergie d'agrégat égale voire inférieure à 2 eV/atome ont d'ailleurs été obtenus par les chercheurs du laboratoire). Comme nous l'avons vu, une énergie cinétique (par atome constituant un *cluster*) mène à la constitution de couches plus épaisses, contenant probablement des fragments de grandes tailles, voire des protéines entières. Une phase d'optimisation est en cours, afin d'obtenir les agrégats d'argon possédant une taille et une énergie permettant un transfert le plus idéal possible.

L'étape suivante sera d'identifier la matière qui a été transférée sur le collecteur. En effet, nous n'avons pas encore certifié le fait que le lysozyme soit transféré avec rétention de son intégrité et de sa conformation, ni la proportion de molécules transférées possédant cette caractéristique. Le lysozyme étant une enzyme, la méthode privilégiée semble consister en des mesures d'activité enzymatique sur le matériel déposé sur les collecteurs, et une comparaison de cette activité avec celle mesurée sur des couches de lysozyme obtenue via d'autres méthodes d'adsorption.

Le transfert moléculaire doit également être investigué pour des protéines possédant des masses diverses, tels que l'angiotensine (1046 Da), la trypsine (23 kDa) ou encore la glucose oxydase (160 kDa).

## Bibliographie, source des Figures et liens internet

- [1] <https://www.futura-sciences.com/tech/definitions/technologie-biotechnologie-15588/>
- [2] Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* (6th edition), Macmillan Higher Education (International Edition). ed.
- [3] <http://dSPACE.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/3953/1/Magister.pdf>
- [4] <https://fr.dreamstime.com/images-stock-structure-d-insuline-humaine-image27081204>
- [5] Seyrek, E., Dubin, P.L., Tribet, C., Gamble, E.A., 2003. Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions. *Biomacromolecules* 4, 273–282. <https://doi.org/10.1021/bm025664a>
- [6] Cunningham, F.E., Proctor, V.A., Goetsch, S.J., 1991. Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poultry Science Journal* 47, 141–163. <https://doi.org/10.1079/WPS19910015>
- [7] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6876?lang=fr&region=BE>
- [8] <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/6Proteases/1Lysozyme/1Lysozyme.htm>
- [9] K.S Birdi, 1997. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, CRC Press. ed. K.S Birdi, New York.
- [10] Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R., 1997. *Principles of colloid and surface chemistry*, 3rd ed., rev. and expanded. ed. Marcel Dekker, New York.
- [11] adapté de <https://medium.com/@macromoltek/what-is-an-elisa-test-baaf61767b23>
- [12] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2006. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 1025–1041. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0574-3>
- [13] Umana, Mirtha., Waller, Jess., 1986. Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system. *Analytical Chemistry* 58, 2979–2983. <https://doi.org/10.1021/ac00127a018>
- [14] Rueger, D.R., Thangavel, K., Oppermann, H., Ozkaynak, E., 1994. Prosthetic devices having enhanced osteogenic properties. 5344654.
- [15] Nithya, V., Murthy, P.S.K., Halami, P.M., 2013. Development and application of active films for food packaging using antibacterial peptide of *Bacillus licheniformis* Me1. *Journal of Applied Microbiology* 115, 475–483. <https://doi.org/10.1111/jam.12258>
- [16] Norde, W., 1986. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science* 25, 267–340. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(86\)80012-4](https://doi.org/10.1016/0001-8686(86)80012-4)
- [17] Hall, D.B., Underhill, P., Torkelson, J.M., 1998. Spin coating of thin and ultrathin polymer films. *Polym. Eng. Sci.* 38, 2039–2045. <https://doi.org/10.1002/pen.10373>
- [18] McShane, M.J., Lvov, Y.M., 2004. Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 1-21. <https://doi.org/10.1081/E-ENN-120013616>
- [19] Caruso, F., Furlong, D.N., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., 1998. Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy. *Langmuir* 14, 4559–4565. <https://doi.org/10.1021/la971288h>

- [20] Zheng, B., Haynie, D.T., Zhong, H., Sabnis, K., Surpuriya, V., Pargaonkar, N., Sharma, G., Vistakula, K., 2005. Design of peptides for thin films, coatings and microcapsules for applications in biotechnology. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16, 285–299. <https://doi.org/10.1163/1568562053654103>
- [21] Johnson, G.E., Gunaratne, D., Laskin, J., 2016. Soft- and reactive landing of ions onto surfaces : concepts and applications. *Mass spectrometry Reviews* 35, 439–479. <https://doi.org/10.1002/mas.21451>
- [22] Verbeck, G., Hoffmann, W., Walton, B., 2012. Soft-landing preparative mass spectroscopy. *Analyst* 137, 4393–4407. <https://doi.org/10.1039/c2an35550g>
- [23] Delcorte, A., 2005. Organic surfaces excited by low-energy ions : atomic collisions, molecular desorption and buckminsterfullerenes. *Physical Chemistry Chemical Physics* PCCP 7, 3395–3406. <https://doi.org/10.1039/b509238h>
- [24] Desiderio, D.M., Loo, J.A., Nibbering, N.M.M., 2013. *Cluster Secondary Ion Mass Spectrometry - Principles and Application*, Wiley. ed. John Wiley & Sons, Inc.
- [25] <https://www.britannica.com/science/surface-analysis/media/1454108/173357>
- [26] Lorenz, M., Shard, A.G., Counsell, J.D.P., Hutton, S., Gilmore, I.S., 2016. Angular Distribution of Molecules Sputtered by Gas Cluster Ion Beams and Implications for Secondary Neutral Mass Spectrometry. *The Journal of Physical Chemistry C* 120, 25317–25327.
- [27] Atkins, Jones, 2008. Chapitre 2 - Liaisons Chimiques, in: *Principes de Chimie*. pp. 57–97.
- [28] Coletti, C., Jaroszeski, M.J., Pallaoro, A., Hoff, A.M., Iannotta, S., Sadow, S.E., 2007. Biocompatibility and wettability of crystalline SiC and Si surfaces, in: 2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Presented at the 2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, IEEE, Lyon, France, pp. 5849–5852.
- [29] Willett, R.L., Baldwin, K.W., West, K.W., Pfeiffer, L.N., 2005. Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 7817–7822. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408565102>
- [30] Ouyang, M., Yuan, C., Muisener, R.J., Boulares, A., Koberstein, J.T., 2000. Conversion of Some Siloxane Polymers to Silicon Oxide by UV/Ozone Photochemical Processes. *Chemistry of Materials* 12, 1591–1596. <https://doi.org/10.1021/cm990770d>
- [31] Zhao, T., Jiang, L., 2018. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 161, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.056>
- [32] Bernoux, F., Piel, J.-P., Defranoux, Christophe, Boher, Pierre, Stehlé, Jean-Louis, Castellon, B., 2013. Ellipsométrie - Théorie, in: *Ellipsométrie - Théorie*. pp. 1–25.
- [33] Azzam, R.M.A., 2009. Ellipsometry (Chapter 16), in: *Handbook of Optics*, Third Edition. Optical Society of America, New York.
- [34] McCrackin, F.L., Passaglia, E., Stromberg, R.R., Steinberg, H.L., 1963. Measurement of the thickness and refractive index of very thin films and the optical properties of surfaces by ellipsometry. *J. RES. NATL. BUR. STAN. SECT. A*. 67A, 363. <https://doi.org/10.6028/jres.067A.040>
- [35] Tompkins, H.G., Irene, E.A. (Eds.), 2005. *Handbook of ellipsometry*. William Andrew Pub. ; Springer, Norwich, NY ; Heidelberg, Germany.
- [36] <https://www.filmetrics.com/refractive-index-database/SiO2/Fused-Silica-Silica-Silicon-Dioxide-Thermal-Oxide-ThermalOxide>

- [37] Schueler, B.W., 2013. Time-of-flight mass analysers, in: ToF-SIMS : Materials Analysis by Mass Spectrometry. John C. Vickerman and David Briggs, pp. 1–38.
- [38] Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V., Zagulin, V.A., 1973. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. Sov. Phys. JETP 37, 45–48.
- [39] [https://www.iontof.com/download/IONTOF\\_TOF-SIMS\\_5\\_Brochure.pdf](https://www.iontof.com/download/IONTOF_TOF-SIMS_5_Brochure.pdf)
- [40] Tyler, B., Rayal, G., Castner, D., 2007. Multivariate analysis strategies for processing ToF-SIMS images of biomaterials. Biomaterials 28, 2412–2423.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.002>
- [41] Bartiaux, S., 1995. . UCL, Faculté des sciences agronomiques, Louvain-la-Neuve, Belgium.